

Aus dem Medizinischen Zentrum für Radiologie  
der Philipps-Universität Marburg

Abteilung für Strahlendiagnostik  
Direktor Prof. Dr. K.J. Klose

---

Des Fachbereichs Medizin der Philipps Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
Standort Marburg

# **Funktionelles MRT von Tumormausmodellen unter Therapie mit Cimetidin**



## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
vorgelegt dem  
Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

von  
**Marcel Seller**  
aus Hamburg  
2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 02.09.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. H. Alfke
1. Koreferent:	PD Dr. G. Zugmaier

# Inhaltsverzeichnis

## Einleitung

1.	Bedeutung von Tumorerkrankungen	6
1.1	Grundlagen	6
1.2	Risikofaktoren	6
1.3	Altersstruktur	7
1.4	Krankheitskosten	7
1.5	Therapiefortschritte	8
1.6	Pankreaskarzinom	8
2	Tumorangiogenese	10
2.1	Grundlagen	10
2.2	Historisches	11
2.3	Studienergebnisse	12
2.4	Angiogenetic Switch	13
2.5	Metastasierung	14
3.	Antiangiogenese	15
3.1	Bedeutung	15
3.2	Endogene Inhibitoren	16
3.3	Wirkungsweisen	18
3.3.1	Indirekte Inhibitoren	18
3.3.2	Direkte Inhibitoren	19
3.3.3	Wirkstoffe mit unklarem Wirkmechanismus	19
3.4	Ausblick	19
4.	MRT	20
4.1	Grundlagen	20
4.2	Historie	21
4.3	Kontrastmittel	22
5.	Die vorliegende Studie	22

## Material und Methoden

1.	Vorbereitung	24
1.1	Herkunft der Zellen	24

1.2	Wachstumsbedingungen	24
1.3	Vorbereitung für die Implantation	25
1.4	Zellzählung	25
1.5	Haltungsbedingungen der Tiere	26
1.6	Tumorzell-Implantation	26
1.7	Randomisierung	27
1.8	Kontrastmittelzubereitung	27
1.9	MRT Planung	27
1.10	Vorbereitung der Tiere zur Messung	29
2	Messungen	30
2.1	MRT-Kontrastmittel	30
2.2	MRT	31
2.3	Verwendete MRT Sequenzen	31
2.4	Datensicherung	32
3.	Auswertung	32
3.1	Software Plattform	32
3.2	Bildauswertung	33
3.2.1	Dynamische Auswertung	33
3.2.1.1	Falschfarbenanalyse	33
3.2.1.2	Quantitative Analyse	35
3.2.2	Volumetrische Auswertung	41
3.2.2.1	MRT-Volumetrie	41
3.2.2.2	Mechanische Messung	45
3.3	Statistische Auswertung	46
3.3.1	Reliabilität	46
3.3.2	Statistische Methodik	46
<b>Ergebnisse</b>		
1.	Volumetrie	47
1.1	MRT-Volumetrie	47
1.2	Mechanische Volumetrie	49
1.2.1	Volumetrie mit ( $V = a \times b^2 \times 0,52$ )	49
1.2.2	Volumetrie mit ( $V = 4/3 \times \pi \times (a/2 \times b/2)^{3/2}$ )	52
1.3	Vergleich der Messmethoden	53

2.	Dynamische Messungen	54
2.1	Slope 1	56
2.2	Time to peak	57
2.3	Integral	58
2.4	mean transit time	59
<b>Diskussion</b>		60
<b>Zusammenfassung</b>		76
<b>Literaturverzeichnis</b>		78
<b>Abbildungsverzeichnis</b>		96
<b>Anhang</b>		
1.	Herleitung der Formel $(V=4/3\pi x(a/2xb/2)^{3/2})$	
2.	Lebenslauf	
3.	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	
4.	Danksagung	
5.	Ehrenwörtliche Erklärung	

# Einleitung

## 1. Bedeutung von Tumorerkrankungen

### 1.1 Grundlagen

Krebserkrankungen gehören nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland. Im Jahr 2003 verstarben in Deutschland laut einer Mitteilung des Statistischen Bundesamtes 853.946 Menschen. Zwar entfiel davon mit 396.622 Todesfällen (46,4 %) der mit Abstand größte Teil auf die Erkrankungen des Kreislaufsystems, aber mit 214.788 Todesfällen (25,2 %) folgen die bösartigen Neubildungen sowohl bei Männern als auch bei Frauen auf dem zweiten Platz. Das bedeutet, dass jeder vierte Sterbefall in der Bundesrepublik im Jahr 2003 auf eine Krebserkrankung zurückzuführen war (alle Angaben laut Statistischem Bundesamt, Wiesbaden). Dies entspricht in etwa der Bevölkerung einer Stadt wie Lübeck, Erfurt oder Aachen. Das Statistische Bundesamt in Wiesbaden geht in seinem Bericht „Krankheitskosten 2002“ davon aus, dass den Menschen allein in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2002 3.216.000 Lebensjahre in Folge von Neubildungen verloren gingen. Hiervon entfallen nahezu gleich viele Jahre auf Frauen und Männer (1.607.000 zu 1.609.000 Lebensjahre).

### 1.2 Risikofaktoren

Zwar ließe sich die Inzidenz gewisser Krebserkrankungen durch die Vermeidung beziehungsweise Beseitigung von Risikofaktoren senken. Als Beispiele hierfür sind der Verzicht auf alle Arten des Tabakkonsums, zur Reduktion der Neoplasmen des respiratorischen Systems, oder die konsequente Eradikation bestehender Helikobakter pylori Infektionen, die maßgeblich zur Entstehung von Magenkarzinomen beitragen (Marshall et al., 2005), zu nennen. Bei anderen Risikofaktoren liegt die Exposition aber bereits Jahrzehnte zurück, den erhöhten Asbestkonzentrationen bei der

Verarbeitung von Dämmstoffen in den sechziger und siebziger Jahren des letzten Jahrhundert oder den hohen Strahlenbelastungen in den Anfängen der Kernenergie und der Strahlendiagnostik werden heute noch etliche Krebsneuerkrankungen zugeschrieben.

### 1.3 Altersstruktur

Dem größten Risikofaktor sind alle Menschen jedoch gleichermaßen ausgesetzt: dem Altern. Krebs ist und bleibt eine Erkrankung, die ältere Menschen weitaus häufiger befällt als jüngere. Das Risiko an einem bösartigen Tumor zu erkranken, ist für 80 jährige Männer in Deutschland 300 mal größer, das gleichaltriger Frauen 200 mal größer als das Risiko 10 bis 15 jähriger gleichen Geschlechts (aus „Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland“, Robert Koch Institut, 1999). Da die Bevölkerung der Bundesrepublik im Schnitt in den letzten Jahrzehnten durchschnittlich immer älter geworden ist, was in erster Linie auf die steigende mittlere Lebenserwartung und die gesunkenen Geburtenraten zurückzuführen ist, ist zu erwarten, dass die Bedeutung der Krebserkrankungen noch weiter zunehmen wird.

So lassen auch die Aufzeichnungen des Krebsregisters des Saarlandes einen Anstieg der Inzidenz von bösartigen Tumoren erkennen.

Dies bedeutet jedoch nicht, dass Krebs für junge Menschen ohne Bedeutung ist. Das Nephroblastom (Wilms Tumor), die akute lymphatische Leukämie oder das Medulloblastom sind nur einige Beispiele für Tumoren, die in erster Linie oder ausschließlich Kinder und Jugendliche befallen.

### 1.4 Krankheitskosten

Abgesehen von der persönlichen Tragödie, die für die Erkrankten entsteht, stellen die bösartigen Neoplasien auch eine enorme Belastung für die Volkswirtschaft dar. Das Statistische Bundesamt beziffert die Kosten, die durch Krebserkrankungen verursacht werden, für das Jahr 2002 auf 14.700.000.000 Euro (laut „Krankheitskosten 2002“, Statistisches

Bundesamt, Wiesbaden, Juli 2004). Das entspricht bei einer Bevölkerung von circa 82,5 Millionen Einwohnern etwa 178 Euro pro Person und Jahr.

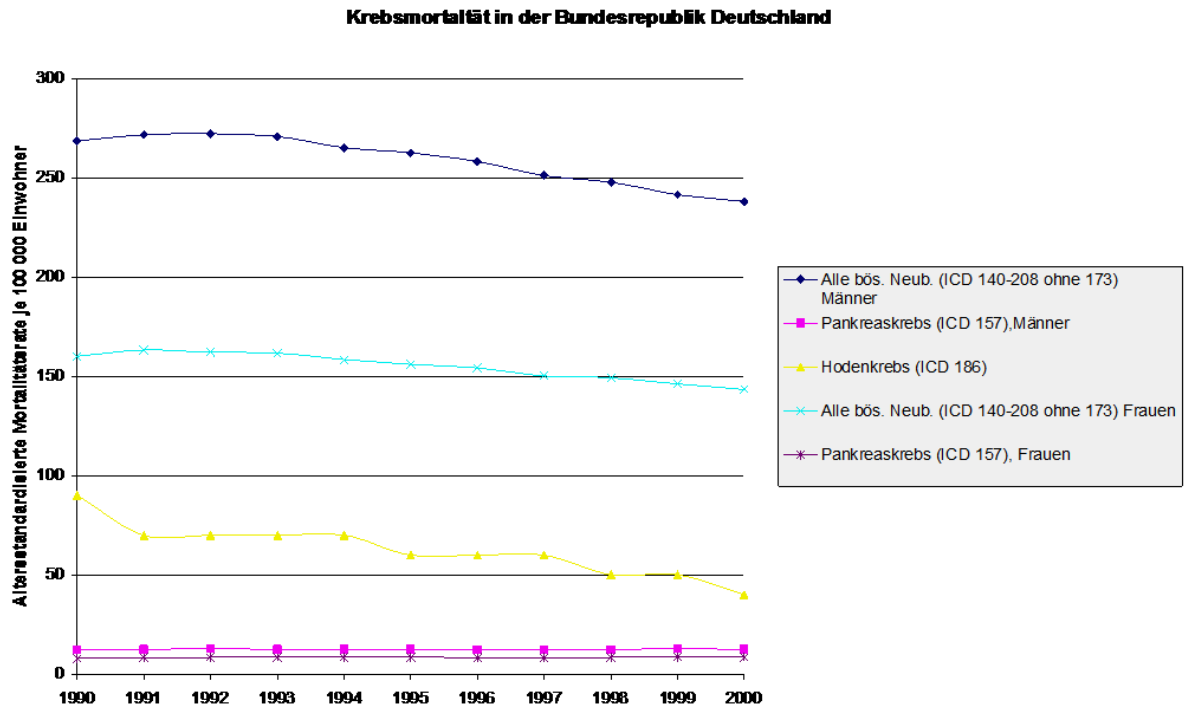
### 1.5 Therapiefortschritte

Nicht zuletzt aufgrund der hohen Aufwendungen in der Krebsforschung ist es in den letzten Jahrzehnten gelungen, sowohl den prozentuellen Anteil der Erkrankten, die geheilt werden können, zu erhöhen (bei Frauen von 44% auf 49% und bei Männern sogar von 25% auf 37% im Zeitraum von 1970 bis 1988 (aus „Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland“, Robert Koch Institut, Berlin, 1999)), als auch die globale Mortalität (Abb. 1, Datenbank des Robert Koch Instituts, [www.rki.de](http://www.rki.de), 5.6.2005) der Krebserkrankungen in der Bundesrepublik zu senken.

### 1.6 Pankreaskarzinom

Diese Fortschritte betreffen aber leider nicht alle Erkrankungen im gleichen Maße. Während in der Behandlung der unterschiedlichen Formen des Hodenkrebses, unter anderem durch die Einführung neuer Chemotherapeutika (Huddart et al., 2005), die Mortalität in den neunziger Jahren mehr als halbiert werden konnte (von 0,9/100000 1990 auf 0,4/100000 2000), ließen sich in der Behandlung des Pankreaskarzinoms kaum Fortschritte erzielen, die eine signifikante Erhöhung der 5-Jahres-Überlebensrate erreichen können. Sie liegt derzeit immer noch bei insgesamt unter 5% für alle Erkrankten und zwischen 20% und 25% für Patienten, bei denen eine komplette chirurgische Resektion gelingt (Loos et al., 2009). Lediglich die mediane Überlebenszeit konnte um wenige Monate verlängert werden und liegt derzeit bei 12 Monaten (Ann et al., 2005; Lockhart et al., 2005; Wray et al., 2005). Es verwundert also nicht, dass die Mortalität des Pankreaskarzinoms entgegen dem Trend aller Krebserkrankungen zwischen 1990 und 2000 sogar gestiegen ist und zwar bei beiden Geschlechtern (von 7,8/100000 auf 8,6/100000 bei Frauen und von 12,2/100000 auf 12,5/100000 bei Männern).





**Abb.1.1** Krebsmortalität in der Bundesrepublik Deutschland von 1990 bis 2000

Der einzige kurative Ansatz, der sich bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms bietet, ist nach wie vor die nur im frühen Stadium sinnvolle, chirurgische Resektion. Allerdings bietet auch diese meist sehr ausgedehnte Operation, die für den Patienten mit erheblichen Belastungen verbunden ist und meist mit Chemo- oder Radiochemotherapie kombiniert werden muss, nur Heilungschancen von selten mehr als 20% (Abe et al., 2005; Delpero et al., 2004; Nagakawa et al., 2004).

Es bleibt also festzustellen, dass die Therapie des Pankreaskarzinoms eine der großen Herausforderungen der Krebsforschung darstellt, die mit den althergebrachten Methoden kaum zu bewältigen scheint.

## 2. Tumorangiogenese

### 2.1 Grundlagen

Als einer der vielversprechendsten neuen Ansätze in der Tumorforschung erscheint die Modulation der Angiogenese, denn das Wachstum neuer Blutgefäße ist essentiell für das Wachstum bösartiger Tumore.

Ein Tumor kann nur die Fähigkeit erlangen, zu einer Größe heranzuwachsen, die klinisch nachweisbar ist, zu metastasieren oder den Organismus, in dem er wächst, zu töten, wenn es ihm gelingt, Anschluss an dessen Blutgefäße zu finden.

Die Tatsache, dass eine Zelle unter dem Einfluss von verschiedenen Onkogenen und dem Versagen von Tumorsuppressorgenen zu einer Krebszelle mutiert, genügt also noch nicht allein, um sich zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung zu entwickeln.

Erst wenn der Tumor in der Lage ist, seine eigenen Blutgefäße zu bilden und zu unterhalten, wird er für den Menschen zur tödlichen Bedrohung. Dieser Vorgang des Einwachsens neuer Blutgefäße wird Tumorangiogenese genannt (Hanahan et al., 2000). Tumoren, die nicht in der Lage sind, Angiogenese herbeizuführen, wachsen nicht über eine Größe hinaus, in der sie gewöhnlich nur dann überhaupt bemerkt werden, wenn sie sich an sichtbaren Stellen wie der Haut oder der sichtbaren Schleimhäute befinden (Achilles et al., 2001).

Die physiologische Angiogenese, wie sie im Wachstum trainierter Muskulatur oder in der Wundheilung stattfindet, unterliegt strengen Regulationsmechanismen (Hurdlicka, 1982; Hoppeler et al., 1988; Adair et al., 1990).

Die Neubildung von Blutgefäßen ist ein sehr komplexer Vorgang, bei dem unterschiedlichste Prozesse nebeneinander ablaufen. Dazu zählen: die Proliferation von Gefäßendothel, der Abbau der eigenen Basalmembran, das Einwachsen in die extrazelluläre Matrix und das Ausbilden der Röhrenform (Aussprunk et al., 1977; Klagsbrun et al., 1999).

Wenn die Regulationsmechanismen der Angiogenese versagen, wird sie zum pathologischen Vorgang, der, wenn er lange genug anhält, das Fortschreiten unterschiedlichster Krankheiten fördern kann (Folkman et al., 1992).

## 2.2 Historisches

Bereits seit dem 19. Jahrhundert ist bekannt, dass Tumoren über eine bessere Gefäßversorgung als das übliche Gewebe verfügen (Warren, 1979). Dieses Phänomen wurde lange Zeit auf eine massive Dilatation der vorbestehenden Gefäße zurückgeführt (Coman et al., 1946). Man ging davon aus, dass es sich um einen Nebeneffekt handelt, der als Reaktion auf Stoffwechselprodukte des Tumors und durch ausgeschwemmte Anteile nekrotischen Tumorgewebes hervorgerufen wird. Es gab zwar Mitte des 20. Jahrhundert erste Veröffentlichungen, in denen die Frage der Gefäßneubildung behandelt wurde (Ide et al., 1939; Algire et al., 1947; Algire et al., 1945), aber die Diskussion, ob ein Tumor, der sich größtmäßig im Bereich von Zentimetern bewegt, in der Lage wäre, sich ausschließlich durch Diffusion zu ernähren, hielt noch einige Jahrzehnte an (Day, 1964).

1971 entwickelte J. Folkman ein Modell, in dem die Angiogenese eine entscheidende Rolle in der Tumorentwicklung spielte (Folkman, 1971). Er ging von einem komplexen Wechselspiel aus, in dem der Tumor die Endothelzellen zum Wachstum stimuliert, die dann wiederum durch die neu gebildeten, den Tumor ernährenden Gefäße diesem weiteres Wachstum ermöglichen. Des Weiteren sah Folkman in diesem Vorgang einen Ansatz für zukünftige Therapieoptionen. Die Basis dieser Überlegungen waren Experimente aus den frühen sechziger Jahren, in denen Folkman und Becker das Tumorstadium in isoliert perfundierten Organen untersucht hatten und sich herausstellte, dass das Tumorstadium ohne Vaskularisation streng begrenzt ist (Folkman et al., 1963).

Diese damals wenig akzeptierten Erkenntnisse haben sich mittlerweile zu einem der meist untersuchten Felder der Tumorbilogie entwickelt. Durch neue Methoden, die sich in der Medizin eröffnet haben, ist es möglich geworden, die Zusammenhänge immer genauer zu untersuchen und zu verstehen. Aktuell ist es so, dass wöchentlich etwa 40 Veröffentlichungen erscheinen, die sich mit Angiogenese befassen.

### 2.3 Studienergebnisse

In diesen Studien wurden viele Untersuchungen durchgeführt, die zum Verständnis der Angiogenese im Zusammenhang mit Tumorwachstum beitrugen. Beispiele hierfür sind:

- In zweidimensionalen Kulturen wachsen Tumoren, denen frisches Nährmedium zur Verfügung gestellt wird, unbegrenzt. Lässt man die Kulturen jedoch in einem weichen Nährmedium dreidimensional wachsen, stoßen sie bei einem Durchmesser von wenigen Millimetern an eine Grenze (Folkman et al., 1973).
- Einige Tumorarten bilden Symptome aus, die man heute der Angiogenese zuschreibt, beispielsweise das Einsprossen von Gefäßen in die Augenvorderkammer beim Retinoblastom, einem Tumor des hinteren Auges. Ein Teil der von Krebserkrankungen hervorgerufenen Symptome wie die Hyperkoagulation, die übermäßige Produktion von Hormonen und die Kachexie folgt der Gegenwart biologisch aktiver Peptide, die aus dem vaskularisierten Tumor ausgeschwemmt werden. Daraus folgt, dass eine frühe antiangiogene Therapie diese Symptome bekämpfen könnte (Folkman, 2003).
- Bevor die Neovaskularisation beginnt oder wenn keine Neovaskularisation stattfindet, bewegt sich die Größe eines Tumors im Bereich weniger Kubikmillimeter. Dies bedeutet jedoch nicht, dass der Tumor langsam wächst. Es gibt Studien, die belegen, dass sich der Zellumsatz nicht wesentlich von dem größerer Tumore unterscheidet, der Unterschied besteht darin, dass sich ein Fließgleichgewicht aus neu gebildeten Zellen und apoptotischen Zellen bildet (Udagawa et al., 2000).
- Das Wachstum von Gehirntumoren in Nacktmäusen kann verhindert oder signifikant verlangsamt werden, wenn ein inaktiver Mutant des Rezeptors für das Protein VEGF, welches essentiell für das Gefäßwachstum ist, durch ein Retrovirus in die Zelle geschleust wird (Millauer, 1994).
- Das Ausschalten des ras-Onkogens in Melanomen führte zu massiver Apoptose der Endothelzellen in den Tumor innerhalb von sechs Stunden. Das Absterben von Tumorzellen beginnt innerhalb weniger Tage und nach zwölf Tagen waren die Tumore verschwunden (Chin, 1999).

## 2.4 Angiogenetic Switch

Die Entartung einer Zelle zur Tumorzelle und der Beginn des Gefäßwachstums sind zwei unterschiedliche Vorgänge, die in der Regel nicht zum selben Zeitpunkt eintreten. Einige Malignome, wie das Zervixkarzinom der Frau, bilden bereits im präkanzerotischen Stadium der Dysplasie neue Gefäße (Silman, 1982). Viele andere Malignome hingegen verbleiben längere Zeit in einem Zustand, in dem sie noch keine neuen Gefäße ausbilden, bevor sie angiogen aktiv werden (Hanahan, 2002).

Welche molekularen Mechanismen diesen Wechsel zum angiogen aktiven Tumor ermöglichen, ist und war Gegenstand zahlreicher Studien. Das erste Protein, das als Baustein in diesem Mosaik entdeckt wurde, war der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) im Jahre 1982 (Shin, 1984). Abnormal hohe bFGF Werte wurden im Urin von Krebspatienten sowie im Liquor Cerebrospinalis von Patienten mit verschiedenen Gehirntumoren gefunden (Li, 1994; Nguyen, 1994). Eine hohe Konzentration des bFGF im Blut von Patienten mit Nierenzellkarzinomen gibt Anhalt auf eine schlechte Prognose (Nanus et al., 1993). Es stimuliert die Zellteilung der Endothelzellen und fördert deren Einwachsen in die Peripherie. Es ist bis heute allerdings nicht vollständig geklärt, wie das bFGF aus den Zellen gelangt, da es keine Sekretionssequenz auf seinem Genlokus trägt. Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich mit der Möglichkeit, dass ein zweites bFGF-bindendes Protein das bFGF im Huckepackverfahren aus der Zelle hinaus befördert (Aigner et al., 2001; Czubayko et al., 1994; Sherif et al, 2001).

Die folgende Tabelle fasst die bedeutendsten Promotoren der Angiogenese zusammen.

Tabelle 1: Angiogenese Faktoren und das Jahr ihrer Entdeckung aus Folkman Tumor angiogenesis, 2003	
Angiogenese Faktor	Jahr
FGF beta	1984
FGF alpha	1984
Angiogenin	1985
Transforming growth factor alpha	1986
Transforming growth factor beta	1986
Tumor necrosis factor alpha	1987
Vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF)	1983+1989
Platelet derived endothelial growth factor	1989
Granulocyte colony-stimulating factor	1991
Placental growth factor	1991
Interleukin-8	1992
Hepatocyte growth factor	1993
Proliferin	1994
Angiopoietin-1	1996
Leptin	1998

## 2.5 Metastasierung

Die Metastasierung ist ein Vorgang, der voraussetzt, dass eine Tumorzelle sich aus dem soliden Tumor herauslöst, über ein Gefäß in die Peripherie transportiert wird, dort im Gewebe hängen bleibt und schließlich anfängt zu wachsen und Anschluss an das Gefäßsystem gewinnt. Es ist also für die erfolgreiche Metastasierung am Anfang und am Ende die Angiogenese von Nöten (Zetter, 1998; Nicolson, 1979). Es gibt Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte innerhalb des Tumors, der Anzahl der ausgeschwemmten Tumorzellen und der Anzahl der Lungenmetastasen zeigen (Liotta et al., 1976; Dvorak et al., 1988). bFGF und VEGF können durch ihre enzymatischen Aktivitäten die

Basalmembran für die Tumorzellen durchlässig machen und so den Weg für die Metastasierung ebnen (Kalebic et al., 1983; Nagy et al., 1989). Die Zellen beginnen nicht in jedem Fall mit dem Wachstum. Sie bleiben mitunter jahrelang mikroskopisch klein. Eine häufige Spätkomplikation des Mammakarzinoms ist das Wachstum von Fernmetastasen mehrere Jahre nach Entfernung des Primarius. Was die versprengten Tumorzellen nach so langer Zeit zum Wachstum anregt oder zur Neovaskularisation befähigt, ist eine noch offene Frage der Krebsforschung. In jedem Fall bietet die Antiangiogenese in der Frage der Bekämpfung der Metastasierung ebenso viele Erfolg versprechende Ansätze, wie in der Behandlung des Primärtumors.

### 3. Antiangiogenese

#### 3.1 Bedeutung

Die auf den vorherigen Seiten dargelegten Forschungsergebnisse vermitteln einen Eindruck des Anteils, den die Angiogenese am Tumorwachstum hat. Es verwundert daher nicht, dass, seitdem diese Zusammenhänge immer genauer verstanden werden, große Anstrengungen unternommen werden, auf der Basis dieses Wissens Therapieoptionen für unterschiedliche Krebserkrankungen zu erlangen. Überall auf der Welt laufen Studien mit dem Ziel, Medikamente mit antiangiogener Wirkungsweise zu entwickeln.

Der Her2/neu Rezeptor Antagonist Trastuzumab (Herceptin) ist ein Beispiel für ein Medikament, das in der Lage ist, das Überleben von 25% bis 30% der Mammakarzinom Patientinnen zu verbessern, und dessen Wirkungsweise hauptsächlich auf Hemmung von Angiogenese Faktoren (TGF-beta, angiopoetin und plasminogen aktivator inhibitor) beruht (McNeil C, 1998).

Die Überlegenheit der Trastuzumab beinhaltenden Therapien sind inzwischen sehr sorgfältig überprüft worden und es ist inzwischen nahezu unbestritten, dass die Einführung dieses Medikaments ein Meilenstein in der Behandlung des Brustkrebses war (Emens, 2005).

Die immunhistochemische Überprüfung des Her2/neu Rezeptorstatus und die Ausrichtung der Therapie darauf, gehört mittlerweile zum absoluten Standard der modernen Brustkrebstherapie.

Im Februar 2004 folgte dann die Zulassung des Rezeptorantagonisten gegen VEGF Rezeptoren Bevacizumab (Avastin) in den Vereinigten Staaten. Dieses Medikament ist in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika z.B. 5-Fluorouracil oder Oxaliplatin in der Lage, das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Intervall von Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen signifikant zu verlängern (Olszewski et al., 2005). Es laufen derzeit Studien, die auch in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, des Nierenzellkarzinoms und diverser anderer solider Tumore vielversprechende Zwischenergebnisse erzielen konnten (Midgeley et al., 2005).

### 3.2 Endogene Inhibitoren

Die Angiogenese unterliegt unter physiologischen Bedingungen in Vivo einer Reihe von Kontrollmechanismen. Es wurden bisher 27 endogene Inhibitoren (Tabelle 2), teils Proteine und teils kleinere Moleküle, identifiziert. Man kann sie grob in zwei Gruppen einteilen: Zum einen die, die sich von der extrazellulären Matrix ableiten, zum anderen die, die anderen Ursprungs sind. Auf die genaue Wirkungsweise aller 27 Inhibitoren kann an dieser Stelle nicht eingegangen werden, es wird zu diesem Zweck auf die im Literaturanhang genannten Artikel verwiesen. Ihre Aufgabe ist es, eine überschießende Aktivität der Angiogenese, die ja eine der Grundbedingungen für die Entstehung klinisch relevanter Tumore darstellt, zu verhindern. Mit dem Versagen der Angiogeneseinhibitoren ist somit neben dem Auftreten der proangiogenetischen Wachstumsfaktoren ein zweiter Mechanismus denkbar, der zum Angiogenetic Switch führt, beziehungsweise zu ihm beiträgt. Ihrer Erforschung wird daher ebenfalls höchste klinische Relevanz bei der Entwicklung kommender Therapieoptionen beigemessen. So sind Endostatin und Angiostatin bereits Gegenstand klinischer Phase II/III Studien (Ziche et al., 2004).



Mit der Entdeckung der endogenen Angiogeneseinhibitoren konnte ein lange unerklärtes Rätsel der Tumorforschung gelöst werden. Es war bekannt, dass bei Entfernung bestimmter Primärtumore (z.B. Mamma Ca, Kolon CA, Osteosarkome) ein rasantes Wachstum von Metastasen einsetzen kann (Sugarbaker et al., 1977). Die Erkenntnis, dass der Tumor selbst in der Lage ist, antiangiogene Stoffe freizusetzen, die das Wachstum der Metastasen bremsen, konnte dieses Phänomen erklären (Rastinejad et al., 1989). Es gibt sogar beschriebene Fälle, in denen ein zweiter Tumor einen Tumor und dessen Metastasen supprimiert (Himmele et al., 1986). Dies legte selbstverständlich nahe, dass es nicht immer ratsam ist, einen Primärtumor so früh wie möglich zu entfernen, insbesondere wenn Fernmetastasierung bekannt ist.

Tabelle 2: Endogene Angiogenese Inhibitoren (aus Nyberg P et al., 2005)		
Angiogenese Inhibitor	Matrix abgeleitet	Jahr
Thrombospondin 1	Ja	1990
Plättchen Faktor 4	Nein	1990
Interferone	Nein	1991
Prolaktin Fragment	Nein	1991
Endorepellin	Ja	1994
2-Methoxyestradiol	Nein	1994
Interleukine	Nein	1995
Anastellin	Ja	1996
lösliche FMS like Tyrosin Kinase I	Nein	1996
Endostatin	Ja	1997
Tumstatin	Ja	1997
Angiostatin	Nein	1997
Prothrombin	Nein	1998
PEX	Nein	1998
Endostatin like Fragment vom Typ Kollagen XV	Ja	1999
Antithrombin III Spaltprodukte	Nein	1999
PEDF	Nein	1999
Troponin I	Nein	1999

Vasostatin	Nein	1999
Thrombospondin 2	Ja	1999
Arresten	Ja	2000
Canstatin	Ja	2000
Fibulin 1D	Ja	2002
Chondromodulin I	Nein	2002
TIMP	Nein	2002
Fibulin 5	Ja	2004

### 3.3 Wirkungsweisen

Folkman schlägt vor, die Angiogenese Inhibitoren in zwei Gruppen einzuteilen, die indirekten und die direkten (Folkman et al., 2003).

#### 3.3.1 Indirekte Inhibitoren

Die Stoffe, die gegen die Angiogenese wirken, indem sie einen Rezeptor blockieren, ein Tumorprodukt blockieren oder die Expression eines Faktors durch die Tumorzelle verhindern bzw. mindern, nennt man indirekte Angiogenese Inhibitoren (Kerbel et al., 2002).

Bei den bisher zur Markteinführung gebrachten Medikamenten Avastatin und Herceptin handelt es sich um Rezeptorantagonisten und somit um indirekte Inhibitoren.

Der große Nachteil der Rezeptorantagonisten ist, dass sie nur in der Lage sind, einen oder wenige vom Tumor gebildeten Angiogenese Faktoren zu blockieren. Induziert eine Tumorzelle die Angiogenese auf unterschiedlichen Wegen, können die anderen Faktoren im Verlauf an Bedeutung gewinnen und der Tumor wird gegen das Medikament resistent.

Es gibt aber auch Tumore, die ausschließlich oder hauptsächlich bFGF als Angiogenese Faktor synthetisieren, z.B. der Riesen-Zell-Tumor des Knochens oder das Angioblastom. Diese Tumore kann man über Jahre mit Interferon alpha therapieren, um das bFGF zu antagonisieren, ohne dass es zur Resistenzentwicklung kommt (Marler et al., 2002; Niemelä et al., 2001).

### 3.3.2 Direkte Inhibitoren

Die direkten Angiogenese Inhibitoren wirken, indem sie in der Endothelzelle deren Teilung blockieren, ihr Wachstum hemmen oder den Lebenszyklus der Zelle verkürzen. Man teilt die Angiogenese Inhibitoren in drei unterschiedliche Gruppen (Folkman et al., 2003):

1. Einige synthetisch hergestellte Peptid Inhibitoren, z.B. Integrin Antagonisten oder Inhibitoren von Metalloproteinasen,
2. Niedrig molekulare Verbindungen wie Thalidomid oder Tetrahydrokortisol,
3. Endogene Inhibitoren, die in der Zelle die Reaktion auf ein weites Spektrum von Angiogenese Promotoren unterdrücken, z.B. Angiostatin, Endostatin, PEX oder Interferon alpha.

Ein Vorteil direkter Angiogenese Inhibitoren ist, dass sie auf normale Endothelzellen wirken. Diese Zellen haben eine wesentlich geringere Neigung zu Mutationen als bereits entartete Krebszellen. Die Konsequenz daraus ist, dass Tumoren keine Resistenzen gegen direkte Angiogenese Inhibitoren entwickeln (Boehm et al., 2002).

### 3.3.3 Wirkstoffe mit unklarem Wirkmechanismus

Bei einigen Verbindungen wurde ein inhibierender Effekt zwar bereits beschrieben, wie dieser zustande kommt, konnte allerdings noch nicht hinreichend geklärt werden.

Der in dieser Studie untersuchte Wirkstoff Cimetidin ist ein Medikament, das in der Behandlung des Magenulkus seit langer Zeit eine Rolle spielt. 1979 stellten Armitage und Sidner fest, dass ebenfalls ein antiproliferativer Effekt auf das Wachstum von Tumoren besteht (Armitage et al., 1979).

### 3.4 Ausblick

Die Zukunft wird zeigen, ob die derzeitigen Hoffnungen auf wirksame Medikamente gegen verschiedene Tumoren mit antiangiogenem Wirkmechanismus berechtigt sind. Es wird erwartet, dass die bereits erreichten Erfolge erst ein Anfang sind. Die zur Marktreife gebrachten Medikamente werden weiter untersucht, um ihre Anwendung auf andere Tumorarten ausweiten zu können und die Wirksamkeit bei den bereits mit

ihnen behandelten Erkrankungen durch neue Wirkstoffkombinationen oder Therapieschemata zu optimieren (Midgeley et al., 2005; De Laurentis et al., 2005).

Ein interessanter Ansatz, den es weiter zu untersuchen gilt, ist die antiangiogene Therapie unter Zuhilfenahme des körpereigenen Immunsystems. Eine Möglichkeit ist die Impfung gegen Epitope des VEGF Rezeptors, um Antikörperbildung gegen diesen herbeizuführen (Wada et al., 2005).

Ein Problem bei all diesen Studien ist die schlechte Überprüfbarkeit im Verlauf der Studie. Sofern es sich um tierexperimentelle Studien handelt, ist es zumindest möglich, nach Abschluss der Versuche durch immunhistochemische Methoden die Gefäßdichte zu bestimmen. Bei klinischen Studien ist auch diese Möglichkeit nur gegeben, wenn der Patient verstirbt und zuvor sein Einverständnis zur Obduktion gegeben hat.

Die Entwicklung moderner MRT gestützter Methoden, die auf nicht invasivem Wege, über die Kontrastmittelanflutung, Aufschluss über die Tumordurchblutung geben, ermöglicht es, neue Erkenntnisse über die Angiogenese im Verlauf und die Wirksamkeit antiangiogener Pharmaka zu gewinnen.

## 4. MRT

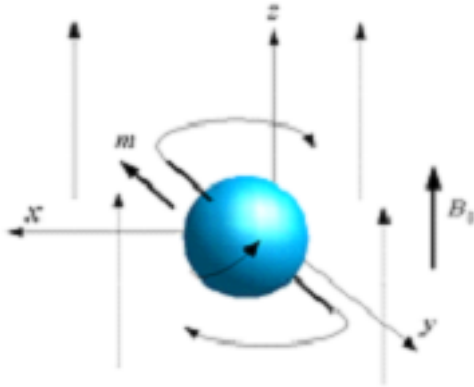
### 4.1 Grundlagen

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine Untersuchungstechnik, die in der Lage ist, Schnittbilder vom Inneren des menschlichen Körpers anzufertigen. Im Gegensatz zur Computertomographie, die hierzu Röntgenstrahlung verwendet, werden die Bilder im MRT mit Hilfe von sehr starken Magnetfeldern und elektromagnetischen Impulsen erzeugt.

Die Wasserstoffatomkerne des Körpers stellen jeder einen magnetischen Dipol dar, d.h. sie sind mit winzigen Stabmagneten vergleichbar. Normalerweise liegen sie völlig ungeordnet im Raum. Setzt man sie einem sehr starken Magnetfeld aus, werden sie in eine bestimmte Ausrichtung gezwungen. Jedes Atom richtet sich nun parallel oder antiparallel zum Magnetfeld aus. Hierbei wird die parallele Ausrichtung bevorzugt, da sie

den energieärmeren Zustand darstellt, der quantitative Unterschied ist allerdings nur sehr gering.

Die Wasserstoffatome, die sich sonst nur um die eigene Achse drehen, drehen sich nun auch um die Achse des Magnetfeldes. Sie beschreiben



**Abb.1.2** Präzessionsbewegung der Kerndrehachse (aus Wikipedia <http://de.wikipedia.org/wiki/Magnetresonanztomographie>)

eine Bewegung, die man mit der eines angestoßenen Kreisels vergleichen kann. Strahlt man nun einen elektromagnetischen Impuls in der Resonanzfrequenz des Wasserstoffkerns (Larmorfrequenz) ein, bewirkt dies zum einen, dass vermehrt

Protonen von der parallelen in die antiparallele Ausrichtung wechseln und zum anderen, dass die Protonen phasensynchron

schwingen. Die Kerne kehren in ihre Ausgangslage zurück, wenn der eingestrahlte Hochfrequenzimpuls endet, hierbei senden sie selbst einen elektromagnetischen Impuls aus. Diesen Vorgang bezeichnet man als Relaxation. Das von den Kernen ausgesendete Antwortsignal wird bei der MRT von Spulen aufgefangen und zur Erzeugung des Bildes verwendet.

#### 4.2 Historie

Pauli entwickelte 1923 als erster die Theorie, dass Atomkerne eine Eigenrotation (Spin) sowie ein magnetisches Moment besitzen. Das Grundprinzip der Magnetresonanz wurde hieraus 1946 unabhängig voneinander von Bloch (Bloch, 1946) und Purcell (Purcell et al., 1946) beschrieben. Das neue Prinzip erlangte schnell große Bedeutung in der Chemie und Physik, da man mit seiner Hilfe spektroskopische Strukturanalysen durchführen konnte.

1952 erhielten Bloch und Purcell für diese Entdeckung gemeinsam den Nobelpreis für Physik.

In den siebziger Jahren gelang es Lauterbur (Lauterbur, 1973) und Damadian (Damadian et al., 1977), die Technik so weit fortzuentwickeln, dass es gelang, Bilder des menschlichen Körpers anzufertigen.

Daraufhin erlebte die MRT eine rasante Entwicklung. 1984 kamen die ersten Kernspin-Tomographen für die klinische Routine auf den Markt. Die Untersuchungstechnik, die ohne ionisierende Strahlung auskommt und im Gegensatz zu den Computer-Tomographen der frühen Generationen in der Lage war, Schnittbilder in jeder beliebigen Ebene anzufertigen, wurde zu einem unverzichtbaren Instrument des diagnostischen Spektrums. Und die Entwicklung dauert noch an. Immer höhere Ortsauflösungen und neue Techniken insbesondere dynamische Kontrastmitteluntersuchungen erweitern die möglichen Anwendungsgebiete stetig. 2003 wurden Damadian und Lauterbur für ihre bahnbrechenden Entwicklungen mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

#### 4.3 Kontrastmittel

Die diagnostischen Möglichkeiten, die sich bei der Auswertung der bildgebenden Verfahren ergeben, hängen entscheidend vom Kontrast der untersuchten Strukturen zueinander ab. Mit steigendem Kontrast der dargestellten Gewebe steigt die Genauigkeit der Untersuchungsergebnisse. Für die MRT werden dabei paramagnetische oder superparamagnetische Substanzen verwendet, die die Relaxation der Wasserstoffprotonen beeinflussen. Klinisch am häufigsten werden Chelate der seltenen Erde Gadolinium eingesetzt, die die T1 Relaxation stark verkürzen und in T1 gewichteten Sequenzen einen positiven Kontrast erzeugen.

#### 5. Die vorliegende Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, den 1979 erstmals beschriebenen antiproliferativen Effekt (Armitage et al., 1979) des Cimetidins auf das Tumorstadium und die Rolle der Antiangiogenese hierbei, in einem Tiermodell zu beobachten und die Frage zu beantworten, ob die Therapieeffekte mit der MRT quantifiziert werden können.

Zu diesem Zweck wurden in immundefizienten Mäusen Pankreaskarzinome als Xenotransplantate erzeugt und diese einer 20-tägigen Therapie mit Cimetidin oder Placebo unterzogen.

Während der 20-tägigen Untersuchungsphase wurden die Tiere regelmäßig kontrastmittelverstärkten dynamischen und hochauflösenden MRT-Untersuchungen unterzogen, um das Größenwachstum und die Durchblutung der Tumoren zu dokumentieren.

# Material und Methoden

## 1. Vorbereitung

### 1.1 Herkunft der Zellen

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um die Zelllinie BxPC-3, die in den 1980er Jahren von einer Arbeitsgruppe aus dem Roswell Park Memorial Institute (Dr. T. M. Chu, Department of Diagnostic Immunology Research und Biochemistry, Buffalo, NY, USA) isoliert, etabliert und charakterisiert wurde. Sie wird kommerziell von der ATCC (American Type Culture Collection Rockville, MD, USA) vertrieben. Sie entstammen aus dem Tumor einer 61-jährigen, weißen Patientin, die 1980 in New York an einem Pankreaskopfkarcinom erkrankte und innerhalb von sechs Monaten daran verstarb.

### 1.2 Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung erfolgte in 25 ml RPMI 1640 Zellkulturmedium (Gibco BRL, Rockville, MD, USA), welches zu 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS: Komplement-Inaktivierung bei 54°C für 30 Minuten; Gibco BRL, Rockville, MD, USA) und zu 1% Glutamin-Penicillin-Streptomycin (GPS; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) enthielt. Das Medium wurde zweimal wöchentlich, spätestens jedoch jeden vierten Tag gewechselt. Die Zellen wurden in einem mit 5% CO<sub>2</sub> belüfteten Inkubator bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (BD Falcon Cell Culture Flasks, Franklin Lakes, NJ, USA) kultiviert.

Zur Ernte und Subkultivierung von 90% konfluent bewachsenen Flaschen wurden die Zellen mit 10 ml sterilem PBS Puffer (Dulbecco's Phosphate Bufferes Saline, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) gewaschen und mit 5 ml 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst. Die Reaktion wurde gestoppt durch Resuspension von 10 ml RPMI / 10% FCS / 1% GPS.



### 1.3 Vorbereitung für die Implantation

Für die Tumorzellimplantation wurden Kulturen aus Rollkulturflaschen verwendet, die nahezu 80% konfluente Zellen enthielten. Wie bereits beschrieben, wurden die Rollkulturflaschen mit 20 ml PBS gewaschen, mit 15 ml 0,05% Trypsin/EDTA Lösung geerntet und mit 35 ml RPMI / 10% FCS / 1% GPS-Medium in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (BD Falcon™, Conical Centrifuge Tubes, Franklin Lakes, NJ, USA) resuspendiert, um eine Einzelsuspension zu erhalten. Zur weiteren 1:10 Verdünnung wurde 1 ml von der Zellsuspension in 9 ml RPMI / 10% FCS / 1% GPS-Medium gegeben. Aus dieser Zellsuspension wurde die Zellzahl mittels Partikelzähler (s. 1.4) bestimmt. Nach Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen für 10 Minuten mit 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in serumfreiem RPMI 1640 so resuspendiert, dass die Konzentration der Zellsuspension  $20 \times 10^6$  Zellen/ml betrug. Bei einem Injektionsvolumen von 200 µl pro Tier entspricht das einer Zellzahl von  $4 \times 10^6$  pro Tier.

### 1.4 Zellzählung

Ein automatischer Partikelzähler (Z1 Series Coulter Counter Cell and Particle Counter, Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) wurde zur Bestimmung der Zellzahlen verwendet. Hierzu wurde aus einer Zellsuspension 0,5 ml entnommen und mit 9,5 ml Isoton II Diluent (Isoton II Azide-Free Balanced Elektrolyte Solution, Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) in einen Counter Becher gegeben.

Die Einstellungen wurden so gewählt, dass Partikel mit einem Durchmesser von mehr als 10,5 µm (Volumen > 600 fl) erfasst wurden, während das Messvolumen 0,5 ml aus dem Counter Becher mit 10 ml Inhalt betrug (Ansaugapertur-Durchmesser: 100 µm). Der Zählmechanismus beruht auf einer Änderung des elektrischen Widerstandes beim Durchtritt nicht leitender Teilchen (z.B. Zellen) durch zwei Elektroden. Höhe und Anzahl dieser Widerstandsänderungen sind proportional zur Größe und Anzahl der Teilchen. Aus dem Ergebnis errechnet sich die Konzentration der Zellsuspension wie folgt:

$$\text{Zellen / ml} = \text{Zählergebnis} / 0,5 \text{ ml} \times 20$$

Die Zählung wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert der errechneten Konzentrationen als Endergebnis angenommen.

### 1.5 Haltungsbedingungen der Tiere

Sämtliche an den Tieren vorgenommenen Eingriffe erfolgten unter tierschutzrechtlichen Aspekten, die Studie wurde von der Tierschutzkommission der Universität Marburg genehmigt.

Die Tiere wurden im Tierstall der Nuklearmedizinischen Abteilung der Universitätsklinik der Philipps Universität Marburg unter Standardbedingungen (26 ° Celsius Lufttemperatur, Licht von 8.00 – 18.00 Uhr, steriles Tierfutter und Wasser ad libitum) in Gruppen zu drei Tieren pro Käfig gehalten. Es handelte sich um immundefiziente SCID-Mäuse (Severe Combined Immuno Deficiency). Es wurden männliche, 6 bis 8 Wochen alte Exemplare mit einem Gewicht von durchschnittlich 25 g (22g-27g) verwendet. Am zweiten Tag nach der Lieferung wurden die Tiere auf autoklavierte Käfige verteilt. Die Tiere lebten in einer abgesperrten, klimatisierten und von Krankheitserregern freien Umgebung. Der Zutritt zum Tierstall erfolgte durch eine Schleuse, in der sterile Bereichskleidung mit Kittel, Überschuhen, Mundschutz, Handschuhen und Haube angelegt werden mussten. Manipulationen an den Tieren wurden ausschließlich unter einer sterilen Umluft-Arbeitsbank vollzogen. Die Injektion an stets sauberer Hautoberfläche und eine präzise Tumormessung wurden gewährleistet, indem der Rücken der Tiere regelmäßig mit einem elektrischen Rasierer rasiert wurde.

### 1.6 Tumorzell-Implantation

Die für die Implantation vorgesehenen Tumorzellen wurden vorbereitet und in der Konzentration  $20 \times 10^6$  Zellen/ml mit sterilen Kanülen (20 G 1 ½, BD Microlance™, Franklin Lakes, NJ, USA) aufgezogen und bereitgelegt.

Die Mäuse wurden in einer für Kleintiere gefertigten Kammer mit Isofluran narkotisiert (VetEQUIP inc, Pleasanton, CA, USA). Nun wurde die narkotisierte Maus mit einem Alkoholtupfer gesäubert und erhielt eine Injektion mit 0,2 ml ( $4 \times 10^6$  Zellen) der Tumorzellsuspension in der

Mittellinie zwischen die Schulterblätter gespritzt. Es sollte ohne Widerstand eine Quaddel entstehen und kein Blut nachlaufen.

### 1.7 Randomisierung

Für den Beginn der Therapie sollte das Tumervolumen zwischen 80 und 110 mm<sup>3</sup> innerhalb von 5 bis 16 Tagen erreicht werden. Es gab eine Placebogruppe und zwei Therapiegruppen (10mg/kg KG und 100 mg/kg KG), auf die die Tiere zugelost wurden.

### 1.8 Kontrastmittelzubereitung

2 ml Kontrastmittel (Magnevist, Schering, Berlin) zu 0,5 mmol Gadopentetsäure pro ml wurden mit 8 ml 0,9 % NaCl Lösung (B.Braun, Melsungen) in eine 10 ml Spritze (Omnifix, B.Braun, Melsungen) aufgezogen. Hiervon wurden 9 ml wieder verworfen und die Spritze mit 0,9 % NaCl Lösung (B.Braun, Melsungen) aufgefüllt, so dass am Ende eine Kontrastmittelkonzentration von 0,01 mmol pro ml erzielt wurde.

### 1.9 MRT Planung

In der ersten Charge wurden für die MRT Messungen der erste, der vierte, der vierzehnte und der zwanzigste Tag nach Therapiebeginn gewählt. Es wurden jeweils ein Tier aus der Placebo Gruppe, ein Tier mit der Dosierung 10 mg Cimetidin/kg KG und ein Tier mit der Dosierung 100 mg Cimetidin/kg KG in eine Gruppe zusammengefasst und gemeinsam untersucht. Die Therapiestarts waren der 30. März 2004 für die erste Gruppe und der 18. Juni 2004 für die zweite Gruppe.

Der Therapiebeginn jeder Gruppe wurde so gewählt, dass möglichst nie mehr als eine Gruppe pro Tag zur Messung anstand.

Es musste hierbei allerdings auch auf die Verfügbarkeit des Geräts und der für die Messung benötigten Mitarbeiter Rücksicht genommen werden.

			Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Fr	26					
Sa	27					
So	28					
Mo	29					
Di	30	0				
Mi	31	1	Messung	0		

Do	1	2	1	Messung	0		
Fr	2	3	2		1	Messung	0
Sa	3	4	3		2		1
So	4	5	4	Messung	3		2
Mo	5	6	5	Messung	4		3
Di	6	7	6		5	Messung	4
Mi	7	8	7		6		5
Do	8	9	8		7		6
Fr	9	10	9		8		7
Sa	10	11	10		9		8
So	11	12	11		10		9
Mo	12	13	12		11		10
Di	13	14	13	Messung	12		11
Mi	14	15	14	Messung	13		12
Do	15	16	15		14	Messung	13
Fr	16	17	16		15		14
Sa	17	18	17		16		15
So	18	19	18		17		16
Mo	19	20	19	Messung	18		17
Di	20	21	20	Messung	19		18
l	21		21		20	Messung	19
Do	22				21		20
Fr	23						21

**Abb.2.1** Der Zeitplan für die erste Messcharge.

			Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Fr	18	0					
Sa	19	1	Messung				
So	20	2		0			
Mo	21	3		1	Messung	0	
Di	22	4		2		1	Messung
Mi	23	5		3		2	
Do	24	6		4		3	
Fr	25	7		5		4	
Sa	26	8		6		5	
So	27	9		7		6	
Mo	28	10		8		7	
Di	29	11		9		8	
Mi	30	12		10		9	
Do	1	13		11		10	
Fr	2	14	Messung	12		11	
Sa	3	15		13		12	
So	4	16		14	Messung	13	
Mo	5	17		15		14	Messung
Di	6	18		16		15	
Mi	7	19		17		16	
Do	8	20	Messung	18		17	
Fr	9	21		19		18	
Sa	10	22		20	Messung	19	
So	11	23		21		20	Messung
Mo	12	24		22		21	
Di	13	25		23		22	

Mi	14		26		24		23		21	Messung	17	
Do	15		27		25		24		22		18	
Fr	16		28		26		25		23		19	
Sa	17		29		27		26		24		20	Messung
So	18		30		28		27		25		21	
Mo	19		31		29		28		26		22	
Di	20		32		30		29		27		23	
Mi	21		33		31		30		28		24	
Do	22		34		32		31		29		25	
Fr	23		35	Messung	33		32		30		26	
Sa	24				34		33		31		27	
So	25				35		34		32		28	
Mo	26				36	Messung	35		33		29	
Di	27						36	Messung	34		30	
Mi	28								35		31	
Do	29								36	Messung	32	
Fr	30										33	
Sa	31										34	
So	1										35	
Mo	2										36	Messung

**Abb. 2.2** Der Zeitplan für die zweite Messcharge

### 1.10 Vorbereitung der Tiere zur Messung

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 0,25 ml einer Lösung bestehend aus 12 % Ketamin (Hostaket, Hoechst), 8 % Xylazin (Rompun, Bayer) und 80 % 0,9 prozentiger NaCL Lösung (B.Braun, Melsungen) narkotisiert.

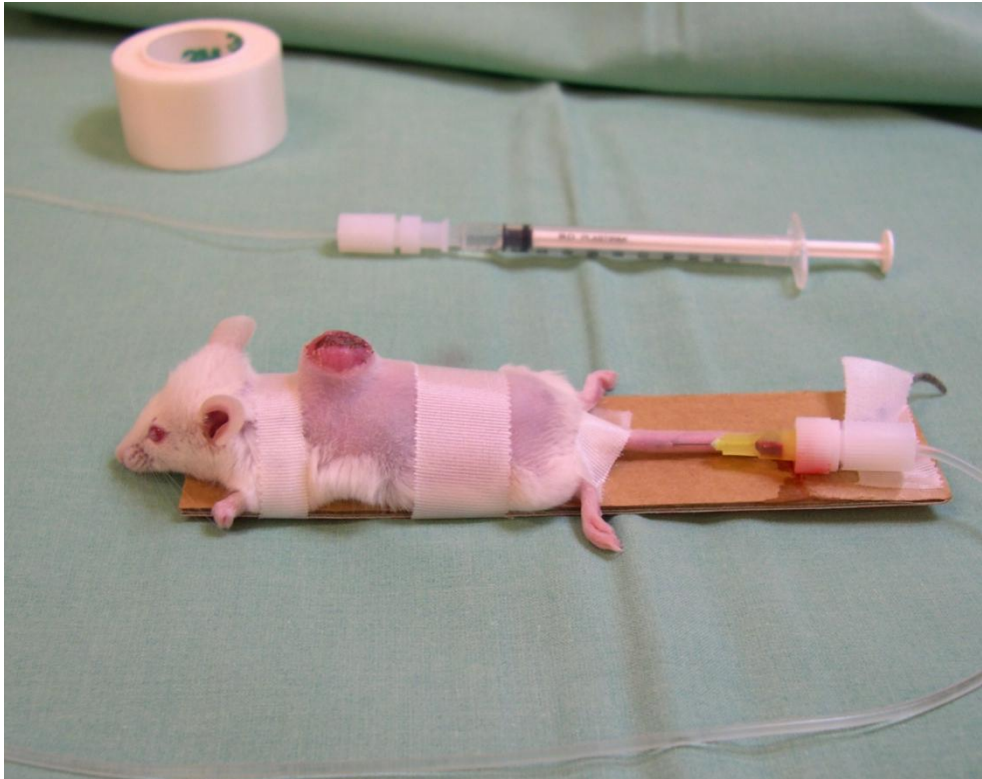
Unmittelbar nach der Injektion wurden die Tiere bis zum Eintreten der vollständigen Bewusstlosigkeit nach circa 3 Minuten in einen abgedunkelten Käfig verbracht.

Für die Messung erfolgte die Fixierung der Tiere auf 4 cm breiten und 15 cm langen Pappstreifen mit Klebestreifen (Leukosilk 2,5cm, 3M) über dem Hals, dem Rumpf, der Schwanzwurzel sowie der Schwanzspitze. Als Unterlage diente ein steriles Tuch.

Eine der beiden Schwanzvenen wurde mit einer 30G (0,3 mm) starken Kanüle (BD Medical Systems, Drogheda, Irland) punktiert.

Die Nadel wurde mit einem Klebestreifen fixiert und mit einem 60 cm langen Verbindungsschlauch (PVCT6.0-60-P-FM; William Cook Europe, Bjaeverskov, Dänemark) verbunden, der mit Kontrastmittel gefüllt war.

Am Ende des Schlauches wurde eine 1ml Spritze (Plastipak; Becton Dickinson, Madrid, Spanien) angeschlossen, die ebenfalls mit Kontrastmittel befüllt wurde.



**Abb. 2.3** Narkotisierte und für die MRT Messung vorbereitete Maus

## 2. Messungen

### 2.1 MRT-Kontrastmittel

Als Kontrastmittel wird Gadolinium-DTPA verwendet. Gadolinium ist eine der so genannten seltenen Erden, wobei es sich um die historische Bezeichnung einer Gruppe von 17 chemischen Elementen handelt. Der Name ist allerdings denkbar unzutreffend, da seltene Erden reine Metalle und keine Erden im Sinne der historischen Bezeichnung für Oxide sind. Zudem sind sie auch nicht selten. Einige von ihnen kommen viel häufiger als beispielsweise Gold oder Silber vor.

Da ein Gadoliniumteilchen über sieben ungepaarte Elektronen verfügt, gehört es zu den stärksten paramagnetischen Substanzen. Jedes Gadolinium-Atom stellt somit ein lokales Magnetfeld dar.

Die Fluktuationsfrequenzen dieser Magnetfelder stimmen mit der Larmorfrequenz der Protonen überein. Dadurch werden vermehrt

Übergänge der Protonen zwischen den Energieniveaus induziert und die T1 Relaxationszeit wird verkürzt. Dies führt zu einer gesteigerten Signalintensität in T1 gewichteten Bildern.

## 2.2 MRT

Die Bilder wurden mit einem 1,0 Tesla Scanner (Magnetom Expert, Siemens, Erlangen, Deutschland) mit einer Anstiegszeit von 1200  $\mu$  Sekunden und 20 mT/m maximaler Gradienten Feldstärke erzeugt. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu steigern, benutzten wir eine extra angefertigte Kleintierspule, wie in Vorarbeiten bereits beschrieben (Heverhagen JT et al., 2004). Es handelte sich hierbei um eine modifizierte Sattelspule mit einer Länge von 10 cm mit einem Innendurchmesser von 4,2 cm.

## 2.3 Verwendete MRT Sequenzen

In drei Ebenen wurden Localizer Sequenzen angefertigt.

0,2 ml Kontrastmittellösung entsprechend 0,02 mmol Gadopentetsäure wurden in die Schwanzvene injiziert. Während und nach der Injektion wurde zur Analyse der Kontrastmittelanflutung ein schnelle Gradienten Echo Sequenz (Flash 2D, TR: 150 ms; TE: 11 ms; FA 70°; FoV 80mm x 40mm; Matrix 64 x 128; 6 Schichten; Schichtdicke 3 mm; 30 Wiederholungen; Untersuchungszeit 30 x 12 sek = 6 min) angefertigt.

Die Injektion erfolgte nach der zweiten Messung.

Zur Analyse der Tumormorphologie, für die MRT gestützte Volumenberechnung und zum Vergleich mit der dynamischen kontrastmittelverstärkten Messung fertigten wir im Anschluss eine DESS Sequenz (3D double echo in steady state TR: 26,8 ms; TE: 9,0 ms; FA: 40° FoV: 80mm x 40mm; Matrix 256 x 128; 40 Schichten; Schichtdicke: 0,9 mm; 1 Messung; Untersuchungszeit 5min 30sek) an.



**Abb. 2.4:** Siemens Somatom. Ein solches Modell wurde für die MRT Untersuchungen verwendet.

## 2.4 Datensicherung

Die Datensätze wurden auf optischen Datenträgern (DEC-S65MO 654MB; Pioneer New Media Technologies INC, Long Beach, USA) gespeichert.

## 3. Auswertung

### 3.1 Software-Plattform

Für die Auswertung der Daten wurde ILAB4 verwendet, eine Software Plattform für Forschung, Entwicklung und klinische Evaluation. Enthalten sind Werkzeuge zur quantitativen Analyse von Anreicherungskurven, pixelbasierten Falschfarbenanalyse verschiedener Parameter und zum Vergleich von Datensätzen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten angefertigt wurden. Des Weiteren sind eine Bewegungskorrektur und ein



Zwei-Kompartimenten-Modell zur Untersuchung der Gewebsperfusion enthalten. Entwickelt wurde die Software im Rahmen des VICORA Projekts (Virtual Institute for Computer Assisted Radiology [www.vicora.de](http://www.vicora.de)) als Kooperation zwischen Mevis (Zentrum für Medizinische Diagnosesysteme und Visualisierung, Universität Bremen) und der Abteilung für Strahlendiagnostik der Phillips Universität Marburg.

### 3.2 Bildauswertung

Die am Kernspintomographen erzeugten Bilder wurden über ein lokales Netzwerk auf eine externe Workstation im DICOM 3 Format übertragen.

Die dynamische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Bildverarbeitungsanwendung Dynavision (ILAB 4, Mevis, Bremen).

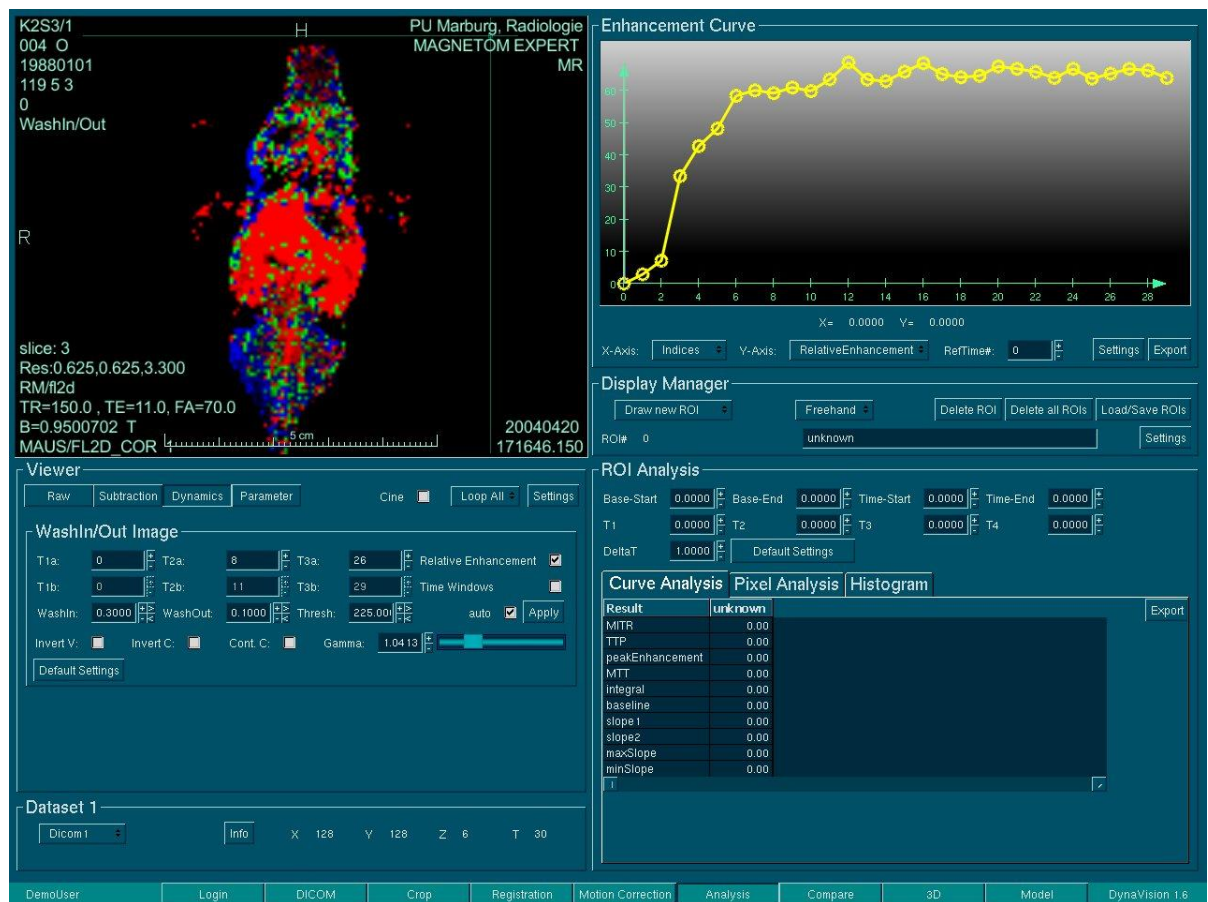
#### 3.2.1 Dynamische Auswertung

##### 3.2.1.1 Falschfarbenanalyse

Die Falschfarbenanalyse dient der besseren Übersichtlichkeit der gewonnenen Daten. Sie ermöglicht es die Ergebnisse der Ein- und Auswaschphase für jeden Pixel in einem einzigen Bild darzustellen. Dies gelingt, indem der WashIn helligkeitskodiert und der WashOut farbkodiert wird. Schneller Washin wird heller dargestellt als langsamer, beim Washout reicht das Spektrum von blau für langsamen WashOut über grün zu rot für sehr schnellen WashOut. Diese Übersicht ermöglicht es aus dem sehr großen Pool gewonnener Daten diejenigen herauszufiltern, in denen Veränderungen am deutlichsten zu Tage treten. Analog hierzu gilt, dass es leichter fällt, die Regionen des Tumors, die am stärksten reagieren, zu identifizieren.

Das Analysemodul von Dynavision wird gestartet. Um gezielt den Tumor untersuchen zu können, wird ein Messzeitpunkt gewählt, zu dem die Kontrastmittelanflutung ihren Höhepunkt erreicht hat, da in diesen Messungen der Tumor am besten zu identifizieren ist. In den Tumor wird eine ROI (Region of Interest) eingezeichnet. Der Viewer wird von Raw auf Dynamics gestellt. Die Zeitpunkte T1a (Beginn der Einwaschphase = Kontrastmittelapplikation), T2a (Wechsel von Einwasch zu Auswaschphase = Signalpeak) und T3a (Ende der Auswaschphase =

Ende der Messung) werden eingestellt. Der Schwellenwert (Threshold) wird auf einen Wert eingestellt, der das Hintergrundrauschen minimiert. Dieser Wert war in unserem Fall 225. Zuletzt werden die Verstärkungen für die Farb- und Intensitätswerte so gewählt, dass eine gute Beurteilung möglich ist. Hierbei ist darauf zu achten, dass in allen Datensätzen die gleichen Werte eingestellt sind, da sonst nur eine bedingte Vergleichbarkeit besteht.



**Abb. 2.5** Die Bedienoberfläche von DynaVision für Falschfarbenanalysen. (Links oben Falschfarbendarstellung eines coronalen Schnittes durch eine Maus, links unten die voreingestellten Parameter für die Erstellung der graphischen Darstellung (rechts oben) des Intensitätsverlaufes über die Zeit über eine ROI (nicht dargestellt). Rechts unten befindet sich der Ergebnisteil für die Analyse des Graphen.

### 3.2.1.2 Quantitative Analyse

Für die quantitative Analyse wird die Schicht aufgesucht, in der der Tumor den größten Durchmesser aufweist. In die Peripherie des Tumors wird die zu analysierende Region als ROI markiert. Die zentrale Region des Tumors wird bewusst ausgespart, da Voruntersuchungen ergeben hatten, dass es sich vorwiegend um nekrotisches bzw. avaskuläres Gewebe handelt (Alfke H et al., 2004). Eine bessere Vergleichbarkeit der Anflutungsverhältnisse und somit eine vereinfachte Erkennung von Artefakten wird ermöglicht, indem in die Niere und in die gluteale Muskulatur ebenfalls ROIs eingezeichnet werden.

Im Diagramm werden als Skalierung der X – Achse die Messungen (0-29) und für die Y- Achse Ratio gewählt. Bei dieser Einstellung wird die relative Verstärkung prozentual zum Referenzzeitpunkt angegeben.

Der Zeitraum vor der Kontrastmittelapplikation, in der Regel 0-1, wird zur Festlegung der basalen Signalintensität mit Base-Start und Base-End eingegrenzt.

Der eigentliche Auswertungszeitraum nach der Kontrastmittelapplikation (1-29) wird mit Time Start und Time End eingegrenzt.

Die Zeitintervalle, die bis zum Zenit der Signalintensität vergehen werden, werden mit T1 und T2 eingegrenzt. T3 und T4 waren für die von uns durchgeführten Messungen ohne Belang.

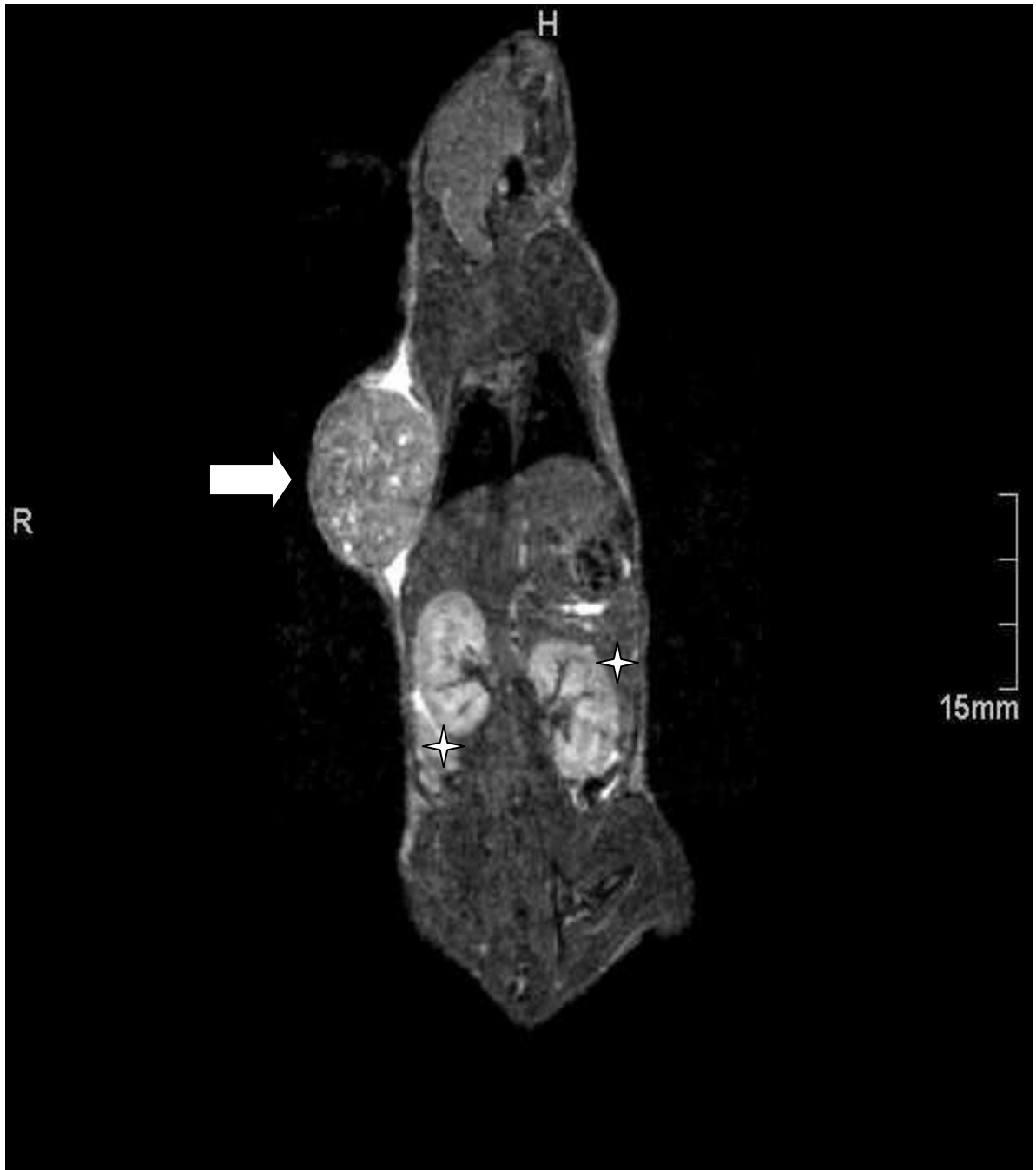
Wenn all diese Parameter korrekt eingestellt sind, berechnet das Programm die folgenden Werte:

-Time to peak (TTP): Die Anzahl der Messzeitpunkte, die von Time Start bis zur höchsten Signalintensität vergehen.

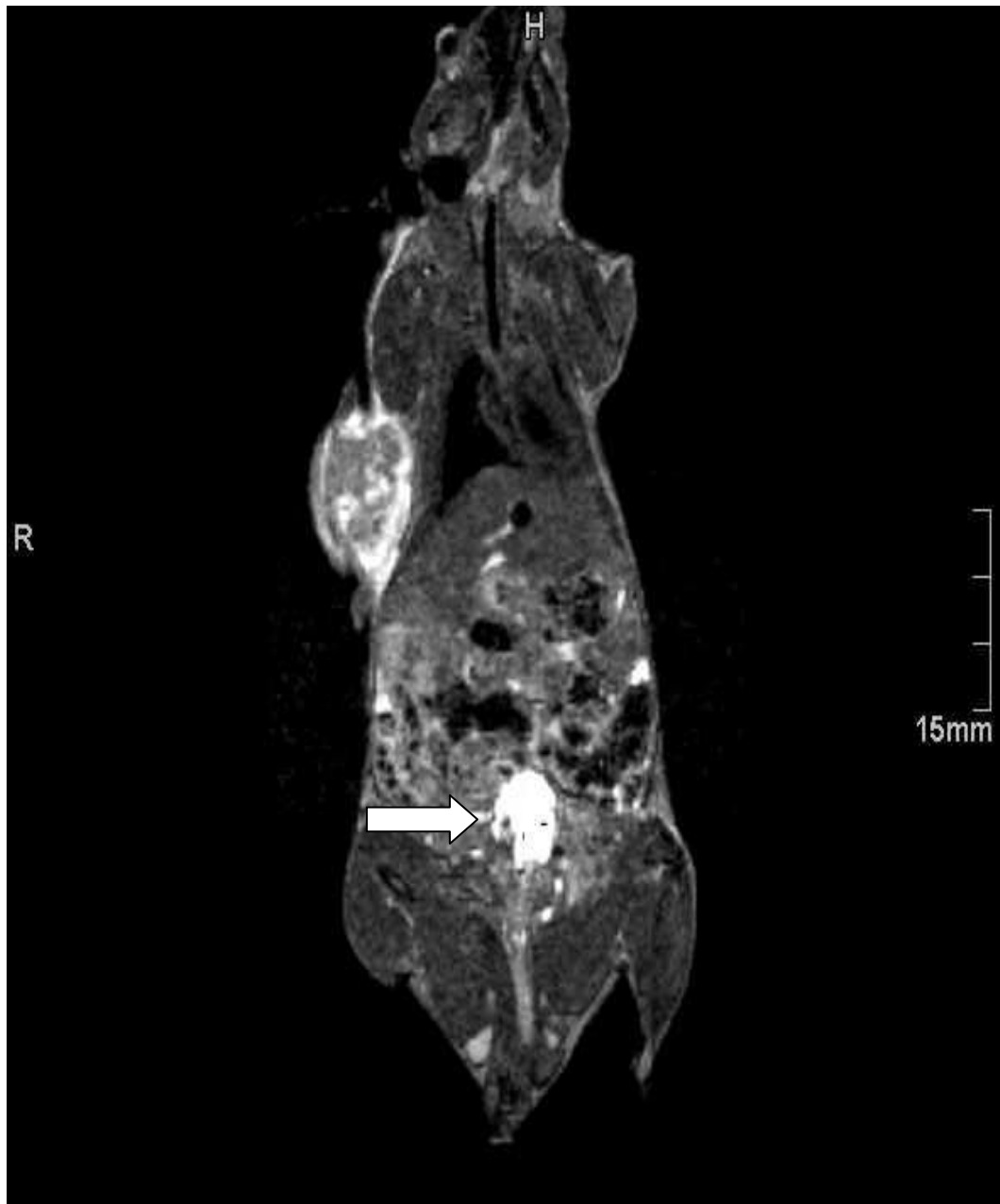
-Slope 1: Die Steigung des Graphen zwischen T1 und T2, also in unserem Fall von der Kontrastmittelapplikation bis zu deren höchsten Konzentration im untersuchten Gewebebezirk.

- Integral: Die Fläche zwischen dem Graphen und der Baseline, welche gebildet wird aus der durchschnittlichen Signalintensität zwischen Base-Start und Base-End. Als Begrenzung auf der X-Achse dienen Time-Start und Time-End.
- Mean Transit Time (MTT): Die mittlere Durchflusszeit des Kontrastmittels. Berechnet wird der Schwerpunkt des Integrals. Die vergangene Zeit bis zum Schwerpunkt gibt die MTT an. Maßgeblich sind wiederum Time-Start und Time-End.

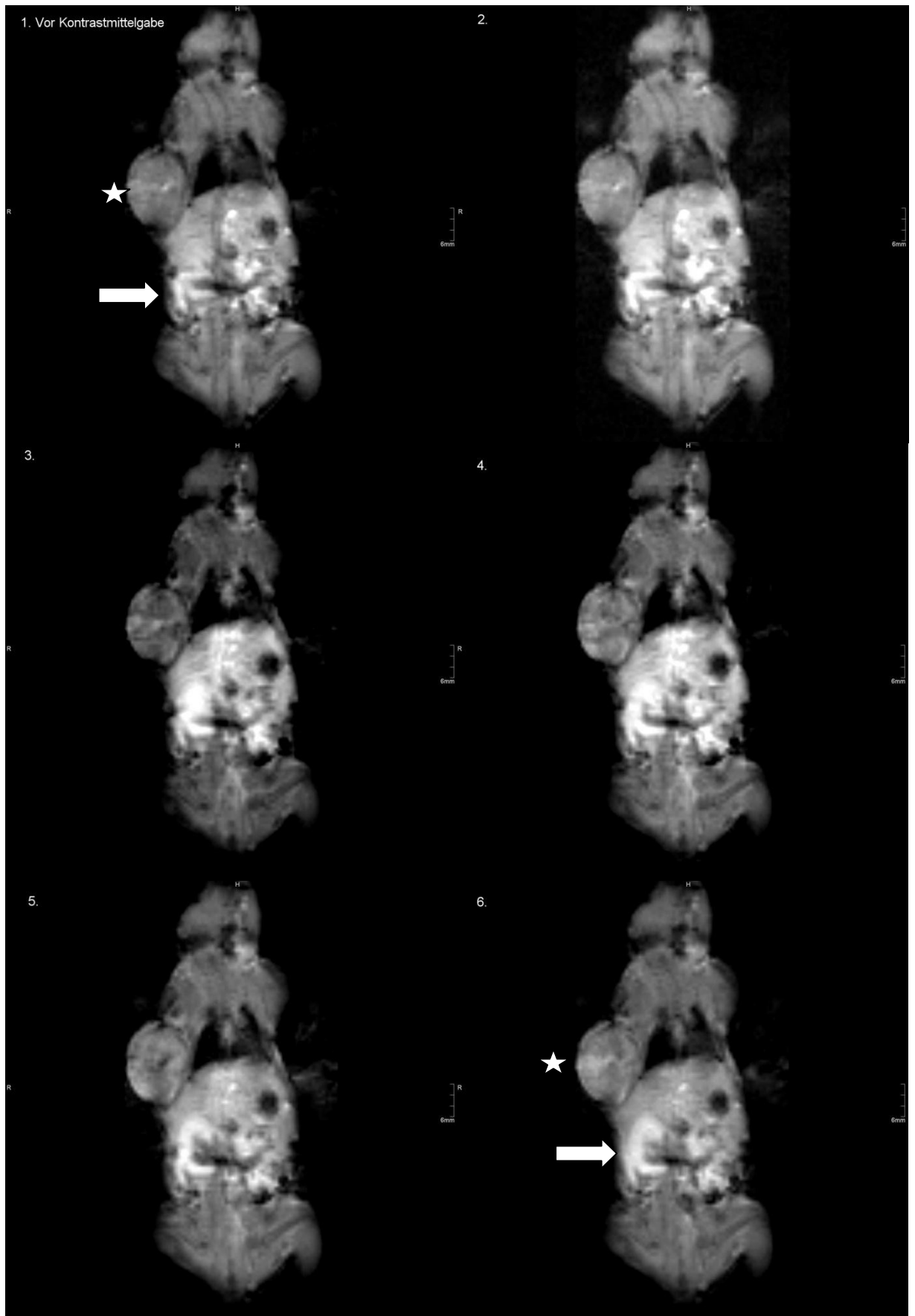




**Abb. 2.7** Zur Verdeutlichung der Anatomie eine hochaufgelöste DESS Aufnahme nach Kontrastmittelapplikation aus derselben Untersuchung. An der rechten Flanke ist der Tumor sehr gut abzugrenzen. (Pfeil)  
Da Gadolinium in erster Linie über die Nieren ausgeschieden wird, sind diese auch besonders signalintensiv und somit gut zu erkennen. (Stern)



**Abb. 2.8** Ein etwas weiter ventral gewählter Schnitt, in dem die Kontrastmittelanreicherung in der Blase (Pfeil) gut zu erkennen ist.



**2.9** Exemplarische Auswahl von Bildern während einer dynamischen Messserie. Man erkennt besonders gut an der Niere (Pfeil), wie die Kontrastmittelanflutung zu einer deutlichen Zunahme der Signalintensität führt. Dieser Effekt ist auch im Tumor erkennbar (Stern), dort ist die Kontrastmittelspeicherung jedoch sehr inhomogen und fluktuierend. Nach dem initialen Anstieg der Signalstärke lässt die Intensität wieder nach. Dieser als Outwash bezeichnete Vorgang ist durch das wieder Absinken der Kontrastmittelkonzentration bedingt.



### 3.2.2 Volumetrische Auswertung

Verwendet wurden drei unterschiedliche Methoden der Tumervolumenmessung, die miteinander verglichen wurden. Die erste Methode basierte auf einer Auswertung der MRT-Bilder. Sie wurden mit einer experimentellen Software basierend auf einer interaktiven Wasserscheidentransformation ausgewertet. Den beiden anderen Methoden lag eine manuelle Messung der Tumorausdehnungen zugrunde.

#### 3.2.2.1 MRT Volumetrie

##### Interaktive Wasserscheiden Transformation

Für die volumetrische Auswertung der MRT Bilder wurde Gradient Watershed App (Mevis Bremen) verwendet. Sie ist ein Bestandteil der modularen Forschungs- und Entwicklungsplattform ILAB4, welche für die medizinische Visualisierung und Bildverarbeitung spezialisiert ist, implementiert. Eine Basisversion dieser Plattform ist im Internet frei verfügbar ([www.mevislab.de](http://www.mevislab.de): Homepage MeVisLab, v1.2, MeVis, Bremen, Juli 2005).

Diese Anwendung arbeitet mit dem Prinzip der Wasserscheiden Transformation. Die Grundidee dabei ist es, ein Bild als dreidimensionale Landschaft zu interpretieren, um diese dann durch eine simulierte Flutung unter Wasser zu setzen. Dann wird mit Hilfe der entstandenen und berechneten Wasserscheiden und Auffangbecken eine topografische Interpretation des Bildes bestimmt (Soille, 2003).

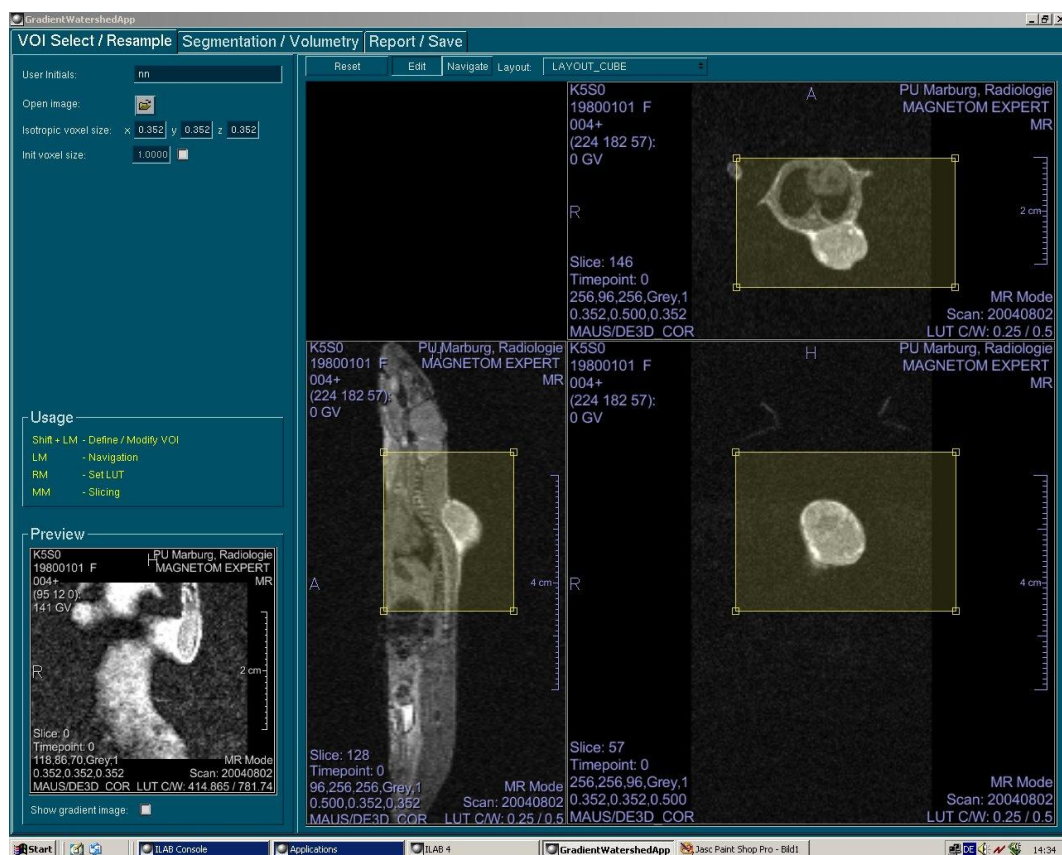
Grundlage der gradienten-basierten Wasserscheiden-Transformation ist nun, die Höhe der Landschaft mit der Stärke des lokalen Bildgradienten zu assoziieren, die nachfolgende interaktive Wasserscheidentransformation arbeitet vollständig im dreidimensionalen (3D) Raum. Daher ist es wesentlich, den Bildgradienten entlang aller drei Koordinatenachsen zu bestimmen.

Es steht eine ganze Reihe von vollautomatischen Methoden der Bildsegmentierung für eine gewisse Anzahl an spezialisierten Aufgaben (Atkins et al., 1998) zur Verfügung. Jedoch existieren nur sehr wenige

Systeme, die besonders bei der Bearbeitung von drei- und vierdimensionalen Daten interaktiv kontrolliert und korrigiert werden können. In der klinischen Anwendung sind die automatischen Methoden häufig bei umfangreichen anatomischen und pathologischen Strukturen und deren Varianten nicht zufriedenstellend.

Die Interaktive Wasserscheiden Transformation (IWT) ist eine neuartige Methode zur effektiven Bearbeitung von multidimensionalen Graustufenbildern (Hahn et al., 2003). Sie basiert auf der Wasserscheiden Transformation und einem erstmalig verwendeten Ordnungssystem.

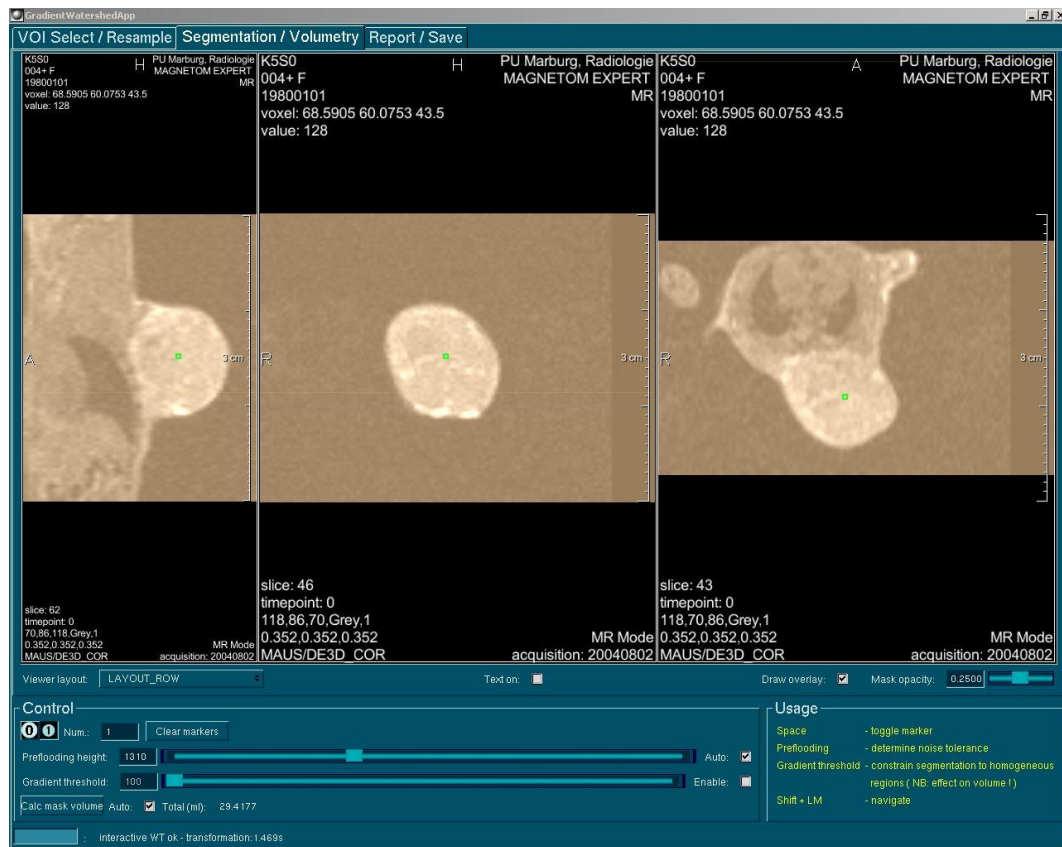
Die IWT wurde bei verschiedenen medizinischen Aufnahmen erfolgreich angewandt, wie z.B. bei Vermessungen und volumetrischen Bestimmung neuroanatomischer Strukturen. Die Methode der IWT vereint automatische und effiziente interaktive Kontrolle in einem Algorithmus und verhindert weitestgehend eine Übersegmentierung, welche ein typisches Problem der herkömmlichen WT ist (Haris et al., 1998).



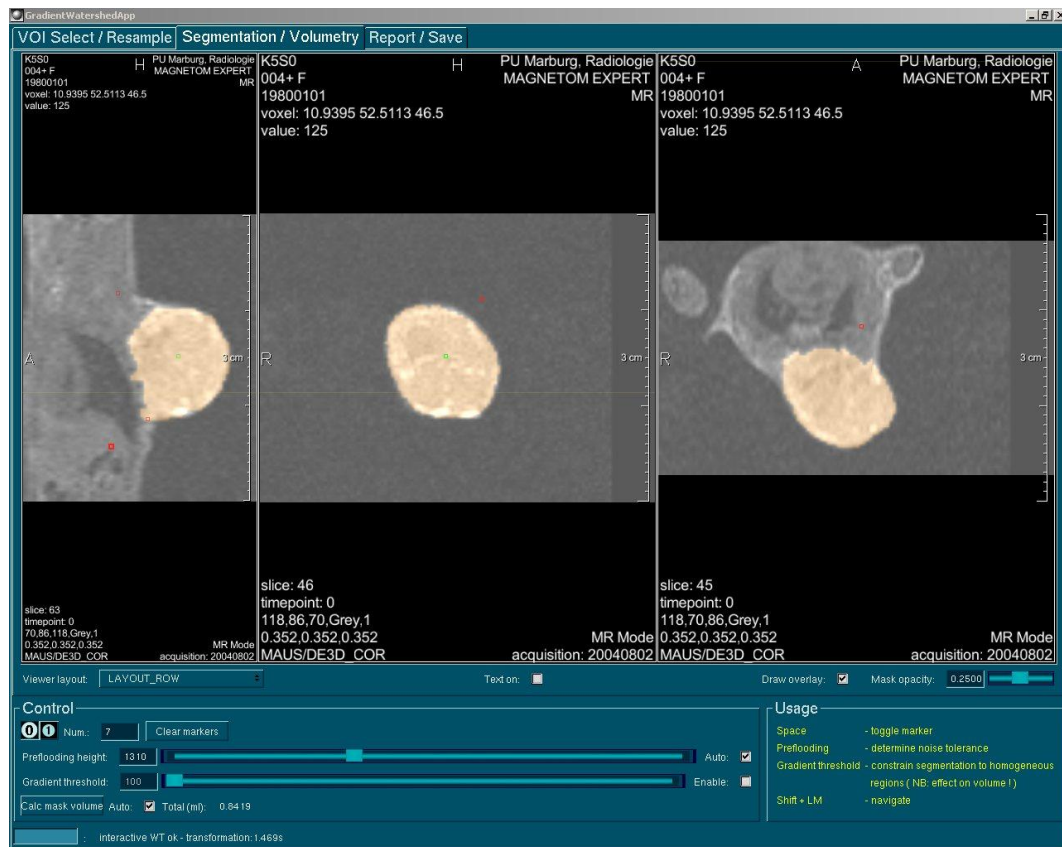
**Abb. 2.10** Gradient Watershed . Der im späteren Verlauf zu untersuchende Bildausschnitt wird im ersten Arbeitsschritt festgelegt.

Nachdem der Datensatz eingelesen wurde, wird in allen drei Ebenen (axial, sagittal und koronar) eine Schicht aufgesucht, in der der Tumor in seiner größten Ausdehnung abgrenzbar ist. Der zu segmentierende Bereich des Tumors wird nun eingestellt. Hierbei ist darauf zu achten, dass ein zu groß gewählter Ausschnitt den Rechenaufwand und die Notwendigkeit von Nachkorrekturen der Segmentierung erhöht. Ein zu klein gewählter Ausschnitt wiederum geht zu Lasten der Übersichtlichkeit des Ergebnisses.

Für die eigentliche Segmentation wird das Menü Segmentation/Volumetry gewählt. Hier wird wieder ein Schnitt aus der Mitte des Tumors gewählt, in dem dieser besonders gut abgrenzbar ist. Im nächsten Schritt wird der Tumor mit einer Include Markierung versehen und die ihn umgebenden Bezirke mit Exclude Markierungen. Anschließend wird in allen Schichten kontrolliert, ob die markierten Bezirke mit dem Tumor übereinstimmen. Gegebenenfalls werden markierte Bezirke, die nicht zum Tumor gehören, mit Exclude ausgeschlossen oder unmarkierte Tumorbezirke mit Include gekennzeichnet. Das Ergebnis kann in ml abgelesen werden.



**Abb. 2.11** Gradient Watershed. Wenn bei der Segmentierung nur der signalintensive Tumor eingeschlossen wird, werden für die Volumenberechnung auch alle anderen Bildbezirke mit zu Grunde gelegt. Der Tumor wird durch einen händisch gesetzten Marker (grüner Punkt) für die Auswertung in allen drei Ebenen markiert.



**Abb. 2.12** Der gleiche Datensatz wie in Abb. 2.10. Nachdem die Tumorperipherie mit einigen wenigen Ausschluss (Exclude) Markierungen versehen wurde (rote Markierungen), ist ausschließlich Tumorgewebe segmentiert.

### 3.2.2.2 Mechanische Messung

Die Tumore werden mit einer elektronischen Schieblehre ausgemessen. Es wird die größte (a) und die kleinste (b) Tumorausdehnung ermittelt. Hierzu wird das Volumen zum einen mit der in den bisher zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten verwendeten Formel  $V=a*b*b*0,52$  und zum zweiten mit der von uns entwickelten Formel  $V=4/3\pi x(a/2xb/2)^{3/2}$  ermittelt.

### 3.3. Statistische Auswertung

#### 3.3.1 Reliabilität

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Messungen der Tumorgroße immer von demselben Untersucher mit demselben Messgerät durchgeführt, welches an jedem Messtag neu kalibriert wurde. Die PC-Auswertung der MRT Untersuchungen wurden ebenfalls immer nur von derselben Person, die zuvor anhand von zwanzig Probedatensätzen eingewiesen worden war, durchgeführt.

#### 3.3.2 Statistische Methodik

Die Daten werden illustriert als Mittelwert  $\pm$  eine Standardabweichung. Unterschiede im Tumorwachstum werden zwischen den Cimetidin therapierten Gruppen und der Kontrollgruppe wurden mit folgenden statistischen Verfahren ausgewertet:

- Einfaktorielle ANOVA
- Scheffé Post Hoc Test

Die Normalverteilung der Daten war mit dem Shapiro Wilks Test überprüft worden. Unterschiede waren als signifikant erachtet worden ab einem p-Wert von  $<0,05$ .

Zur Quantifizierung der Übereinstimmung der unterschiedlichen Methoden zur Tumolvolumenbestimmung (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall) wurde ein scatter plot der Messungen gegen den Mittelwert der Messungen jedes einzelnen Tieres erstellt. Zur Auswertung aller statistischen Daten wurde SPSS 13.0 für Windows verwendet.

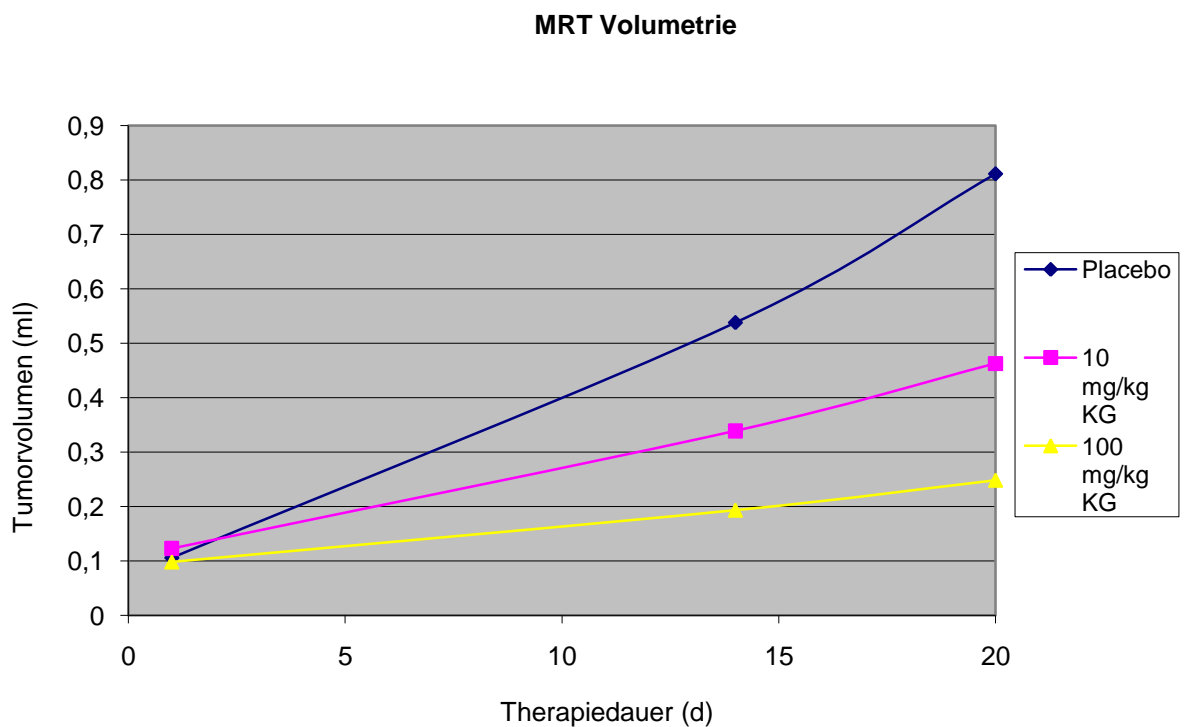
# Ergebnisse

Es wurden insgesamt 27 Mäuse in die Untersuchung miteinbezogen. Die Tumorimplantation war bei allen Tieren problemlos möglich. Vier Tiere verstarben während der MRT Messung unter der Narkose, zwei Tiere verstarben in der Nacht nach der Messung und zwei Tiere verstarben bei weit fortgeschrittenem Tumorwachstum.

## 1. Volumetrie

Die Auswertung aller Messdaten mit dem Shapiro-Wilks Test ergab normal verteilte Werte für alle manuell und digital erhobenen Werte.

### 1.1 MRT-Volumetrie

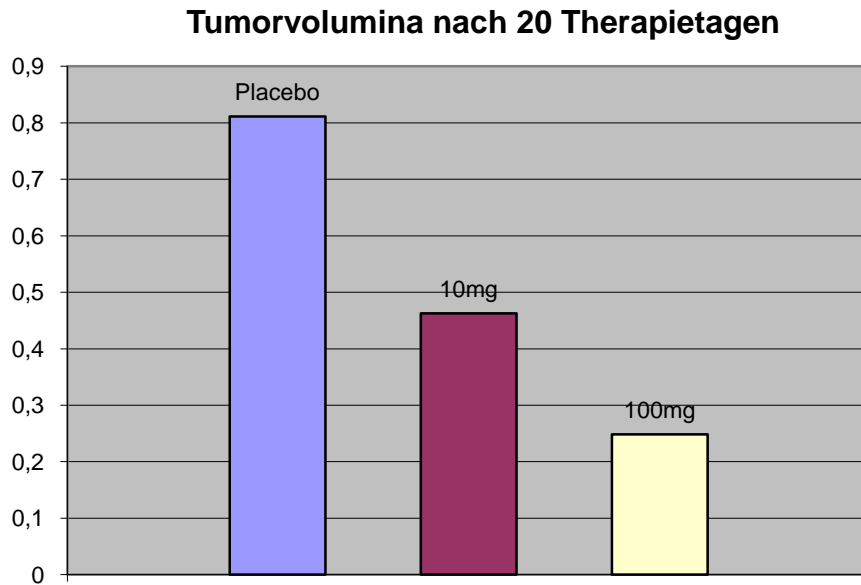


**Abb. 3.1** Größenzunahme der Tumore im Therapiezeitraum ermittelt mit dem MRT

Es wurden 72 MRT-Untersuchungen vorgenommen. In drei Fällen war eine Auswertung wegen zu großer Bewegungsartefakte unmöglich und in einem Fall erfasste das FoV (Field of View) den Tumor nur unvollständig. Die Analyse dauerte für jeden Datensatz ca. 10 Minuten. Die Volumenmessung am ersten Tag nach Tumorimplantation zeigte durchschnittliche Startvolumen, die bei 106 mm<sup>3</sup> (Standardabweichung SD=40 mm<sup>3</sup>) in der Placebogruppe, 123 mm<sup>3</sup> (SD=30 mm<sup>3</sup>) in der 10 mg Cimetidin/kg Gruppe und 98 mm<sup>3</sup> (SD=31 mm<sup>3</sup>) in der 100 mg Cimetidin/kg lagen. Nach 20 Tagen Therapie war das durchschnittliche Volumen in der Placebogruppe 811 mm<sup>3</sup> (SD=392 mm<sup>3</sup>), in der 10 mg/kg Gruppe 463 mm<sup>3</sup> (SD=264 mm<sup>3</sup>) und in der 100 mg/kg Gruppe 248 mm<sup>3</sup> (SD=47 mm<sup>3</sup>). Dies entspricht einer Wachstumsinhibition im Vergleich zur Placebogruppe von 43 % in der 10 mg/kg Gruppe und 69% in der 100 mg/kg Gruppe nach 20 Therapietagen. Die einfaktorielle ANOVA für die Differenz der Messungen des 20. und des 1. Tages ergab einen p-Wert von 0,008 zwischen den Gruppen und somit Signifikanz. Der mit dem Scheffé post hoc Test ermittelte p-Wert betrug nach 20 Tagen in der 10 mg/kg Gruppe im Vergleich zur Placebo Gruppe 0,084, somit ist die gemessene Inhibition nicht signifikant, in der 100 mg/kg Gruppe war der p-Wert jedoch mit 0,01 eindeutig im Signifikanzbereich von <0,05.

In der Messung nach 5 und 14 Tagen zeigten sich noch keine signifikanten Inhibitionen, ein Trend zur Inhibition war allerdings erkennbar.



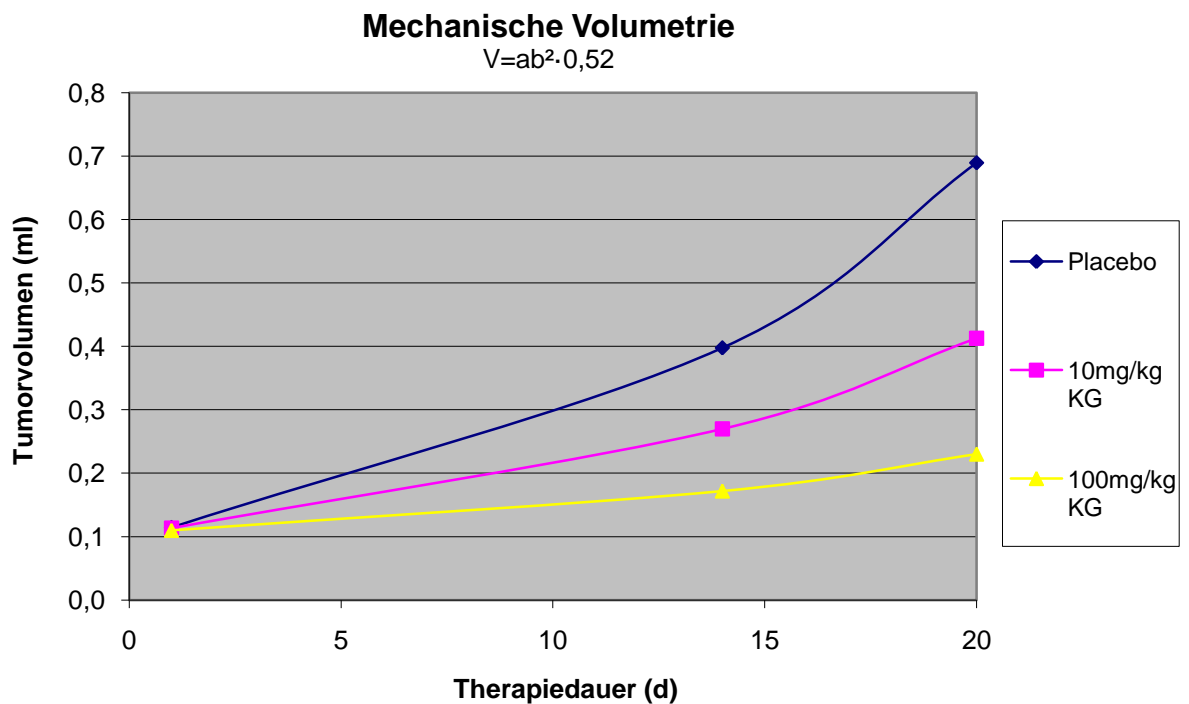


**Abb. 3.2** Tumorumina nach 20 Therapietagen ermittelt mit dem MRT in ml

#### 1.2 Mechanische Volumetrie

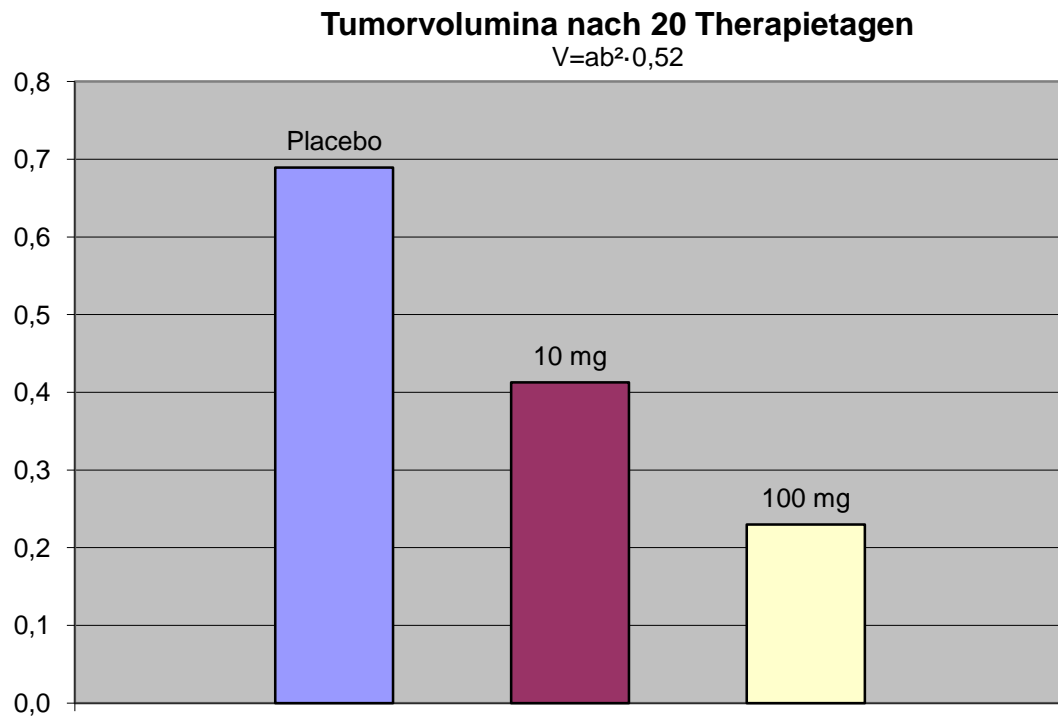
Es wurden 73 mechanische Messungen durchgeführt, die alle ausgewertet werden konnten.

##### 1.2.1 Volumetrie mit ( $V = axb^2 \times 0,52$ )



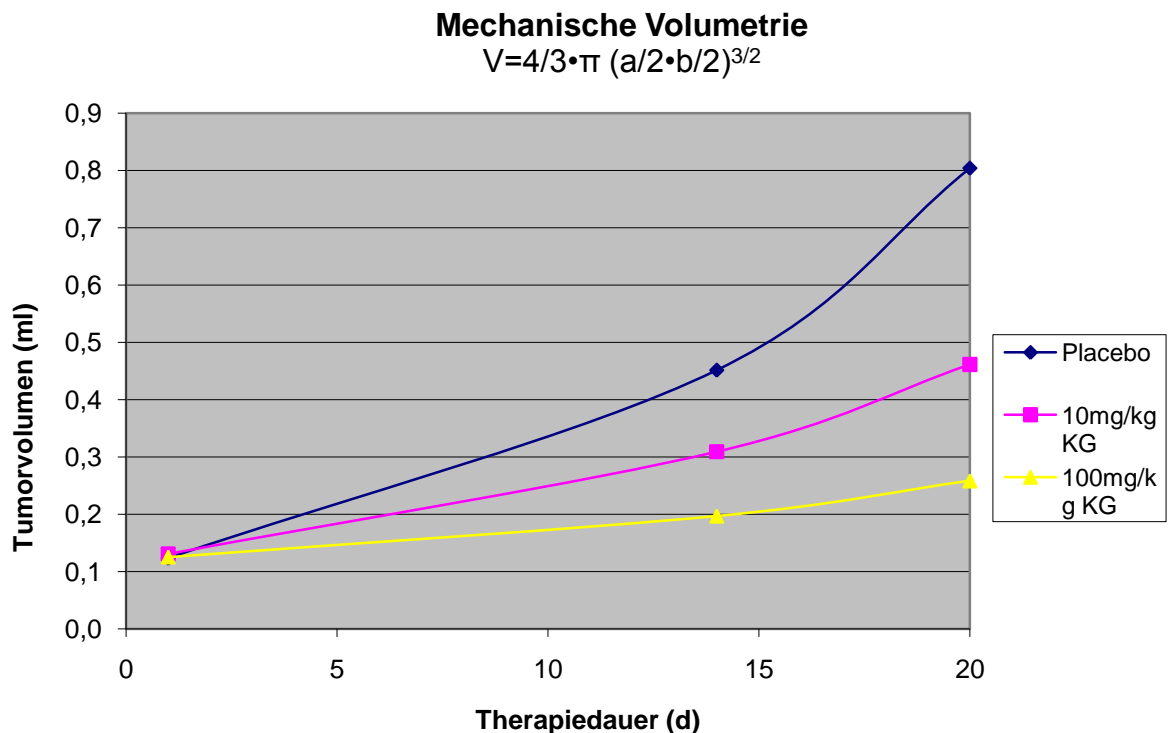
**Abb. 3.3:** Größenzunahme der Tumore im Therapiezeitraum ermittelt mit der Schieblehre und der Formel  $V = axb^2 \times 0,52$

Die Volumenmessung am ersten Tag nach Tumorimplantation zeigte durchschnittliche Startvolumen, die bei 114 mm<sup>3</sup> (Standardabweichung SD=17 mm<sup>3</sup>) in der Placebogruppe, 114 mm<sup>3</sup> (SD=16 mm<sup>3</sup>) in der 10 mg Cimetidin/kg Gruppe und 110 mm<sup>3</sup> (SD=19 mm<sup>3</sup>) in der 100 mg Cimetidin/kg lagen. Nach 20 Tagen Therapie war das durchschnittliche Volumen in der Placebogruppe 690 mm<sup>3</sup> (SD=311 mm<sup>3</sup>), in der 10 mg/kg Gruppe 413 mm<sup>3</sup> (SD=224 mm<sup>3</sup>) und in der 100 mg/kg Gruppe 230 mm<sup>3</sup> (SD=96 mm<sup>3</sup>). Dies entspricht einer Wachstumsinhibition im Vergleich zur Placebogruppe von 40 % in der 10 mg/kg Gruppe und 67% in der 100 mg/kg Gruppe nach 20 Therapietagen. Die einfaktorielle ANOVA für die Differenz der Messungen des 20. und des 1. Tages ergab einen p-Wert zwischen den Gruppen von 0,006 und somit Signifikanz. Der mit dem Scheffé post hoc Test ermittelte p-Wert betrug nach 20 Tagen in der 10 mg/kg Gruppe im Vergleich zur Placebo Gruppe 0,06, somit ist die gemessene Inhibition nicht signifikant, in der 100 mg/kg Gruppe war der p-Wert jedoch mit 0,009 eindeutig im Signifikanzbereich von <0,05. In den Messungen nach 5 und 14 Tagen zeigten sich noch keine signifikanten Inhibitionen.



**Abb. 3.4:** Tumorvolumina nach 20 Therapietagen in ml ermittelt mit der Schieblehre und der Formel  $V=ab^2 \cdot 0,52$

### 1.2.2 Volumetrie mit ( $V=4/3\pi x(a/2xb/2)^{3/2}$ )

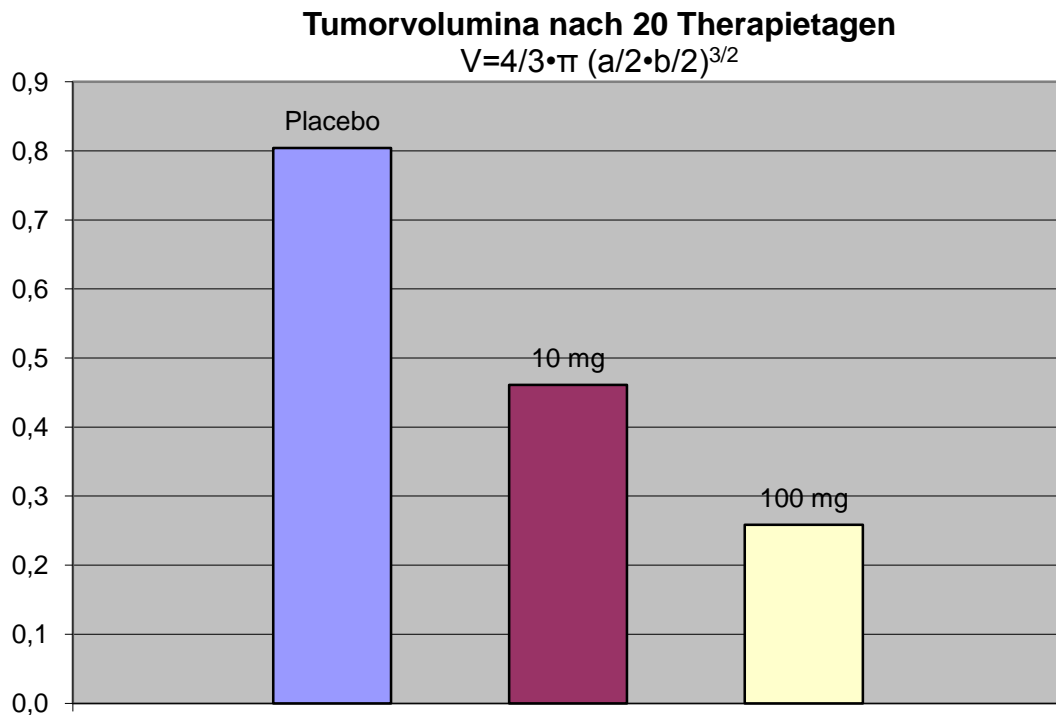


**Abb. 3.5** Größenzunahme der Tumore im Therapiezeitraum ermittelt mit der Schieblehre und der Formel  $V=4/3\pi x(a/2xb/2)^{3/2}$

Die Volumenmessung am ersten Tag nach Tumorimplantation zeigte durchschnittliche Startvolumen, die bei 123 mm<sup>3</sup> (Standardabweichung SD=23 mm<sup>3</sup>) in der Placebogruppe, 131 mm<sup>3</sup> (SD= 23 mm<sup>3</sup>) in der 10 mg Cimetidin/kg Gruppe und 125 mm<sup>3</sup> (SD=28 mm<sup>3</sup>) in der 100 mg Cimetidin/kg lagen. Nach 20 Tagen Therapie war das durchschnittliche Volumen in der Placebogruppe 804 mm<sup>3</sup> (SD=358 mm<sup>3</sup>), in der 10 mg/kg Gruppe 461 mm<sup>3</sup> (SD=225 mm<sup>3</sup>) und in der 100 mg/kg Gruppe 258 mm<sup>3</sup> (SD=103 mm<sup>3</sup>). Dies entspricht einer Wachstumsinhibition im Vergleich zur Placebogruppe von 43 % in der 10 mg/kg Gruppe und 68% in der 100 mg/kg Gruppe nach 20 Therapietagen. Die einfaktorielle ANOVA für die Differenz der Messungen des 20. und des 1. Tages ergab einen p-Wert von 0,006 zwischen den Gruppen und somit Signifikanz. Der mit dem Scheffé post hoc Test ermittelte p-Wert betrug nach 20 Tagen in der 10 mg/kg Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe 0,056 somit ist die

gemessene Inhibition nicht signifikant, in der 100 mg/kg Gruppe war der p-Wert jedoch mit 0,008 eindeutig im Signifikanzbereich von  $<0,05$ .

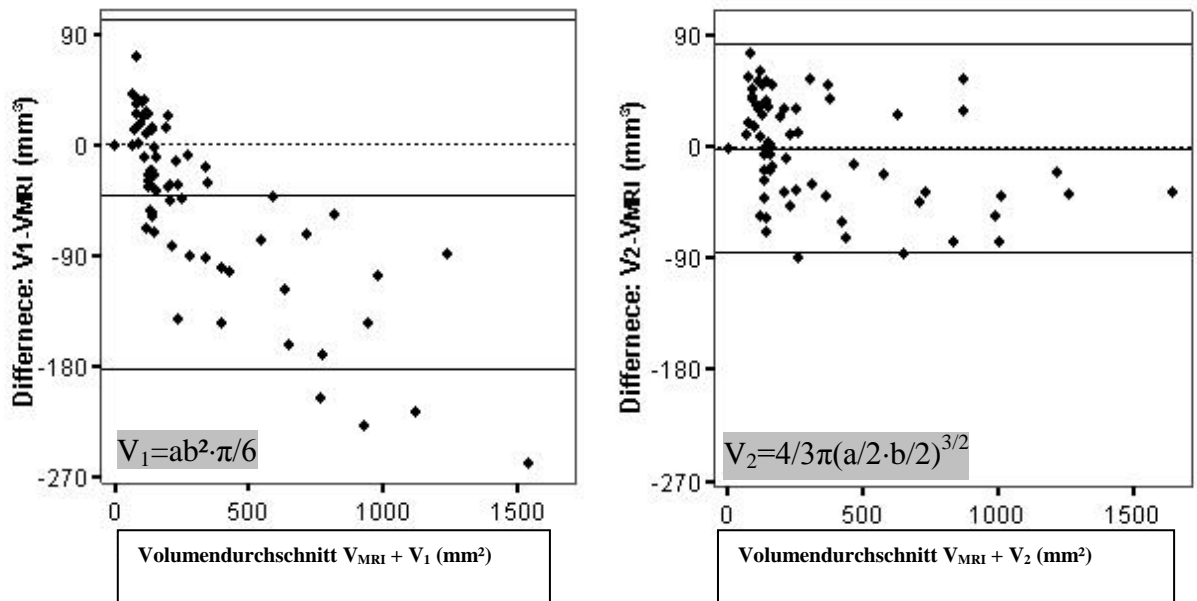
In der Messung nach 5 und 14 Tagen zeigten sich noch keine signifikanten Inhibitionen.



**Abb. 3.6** Tumorvolumina in ml nach 20 Therapietagen, ermittelt mit der Schieblehre und der Formel  $V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (a/2 \cdot b/2)^{3/2}$

### 1.3 Vergleich der Messmethoden

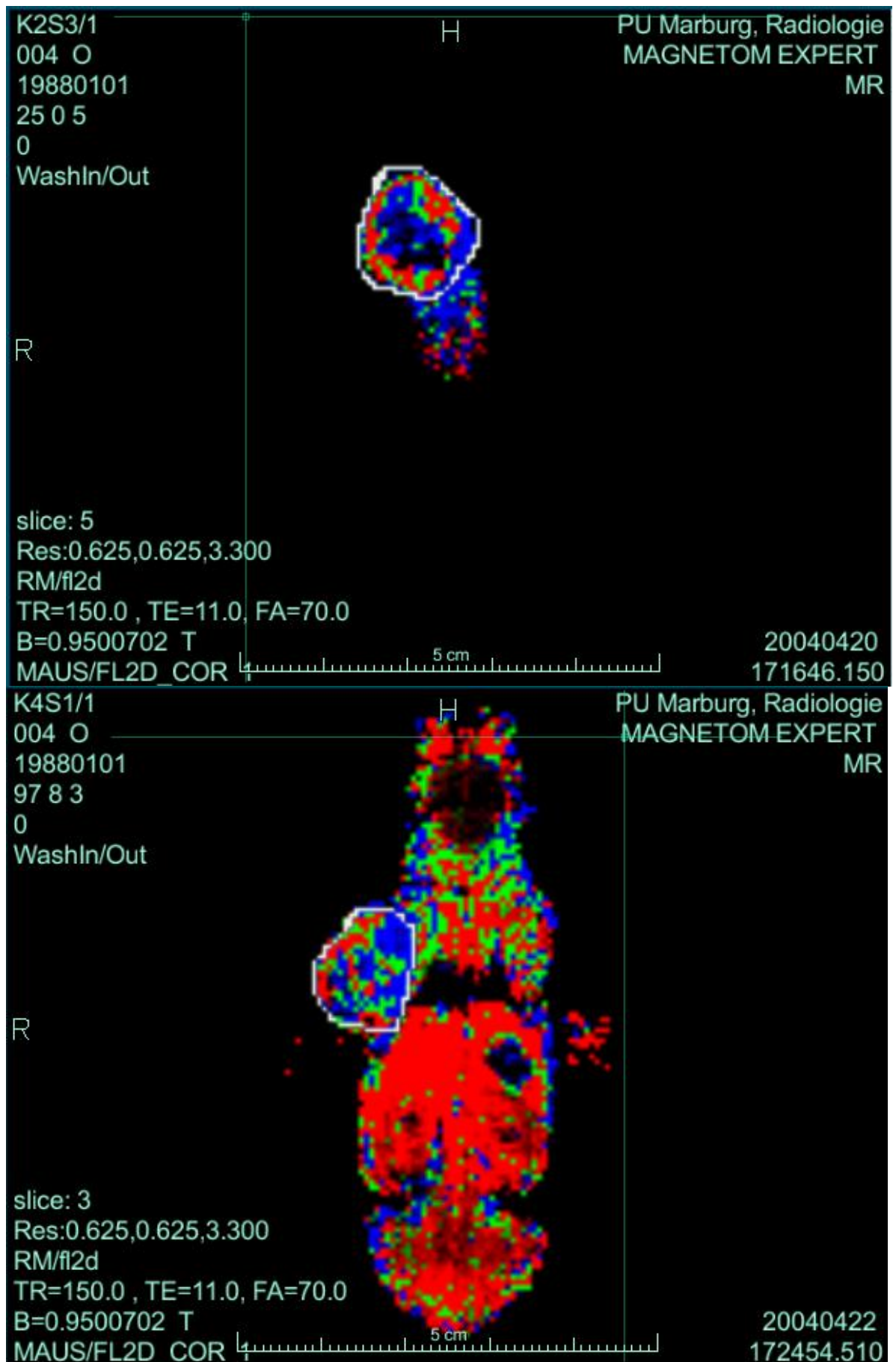
Die untenstehende Abbildung zeigt unsere statistische Aufarbeitung der mechanischen Messungen gegen die MRT-Messung. Bei den kleinen Tumoren zeigte sich in beiden Methoden eine gute Übereinstimmung. Wenn die Tumorvolumina 200 mm<sup>3</sup> überstiegen, beobachteten wir eine zunehmende linear verlaufende Unterschätzung der mechanisch ermittelten Tumorvolumina im Vergleich mit den im MRT separierten Volumina, wenn die Formel  $(a^2 \cdot b \cdot 0,52)$  verwendet wurde. In den Berechnungen mit der Formel  $V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (a/2 \cdot b/2)^{3/2}$  korrelierten die Ergebnisse bei kleinen und großen Tumoren ohne große Abweichungen.



**Abb. 3.7** Vergleich der manuell ermittelten Messwerte gegen die Ergebnisse der MRT-Messungen.

## 2. Dynamische Messungen

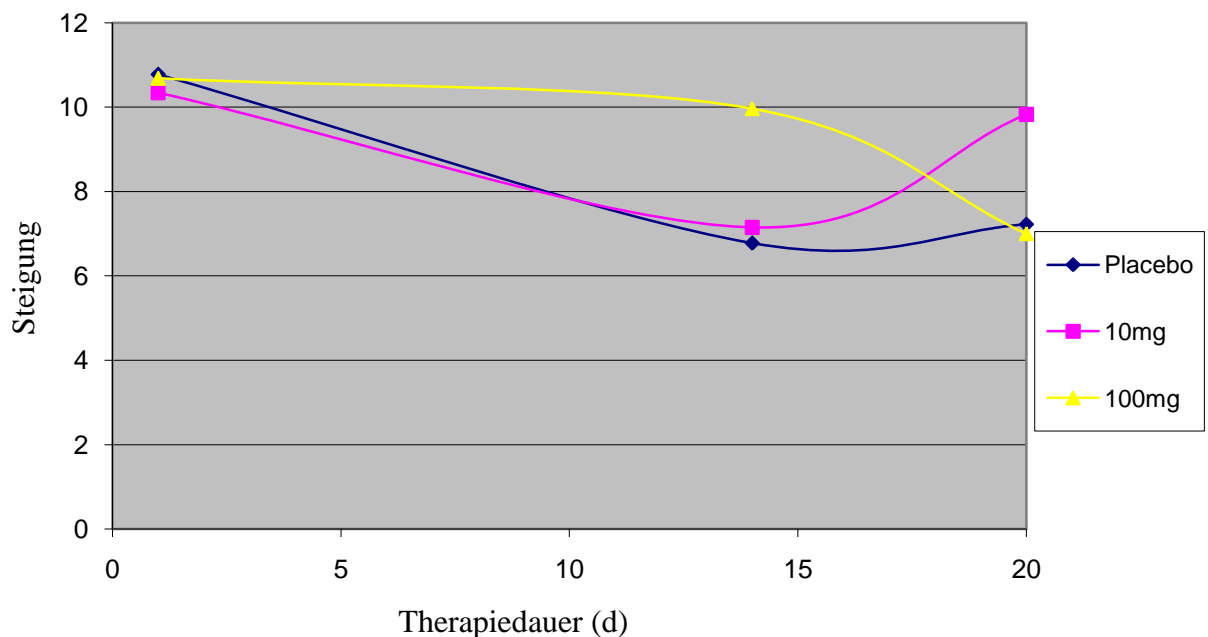
Die Auswertung der Bilder mit Dynavision erfolgte zunächst als Falschfarbenanalyse der Ein- und Auswaschphase. Die Kontrastmittelanreicherung im Tumor in den unterschiedlichen Gruppen wurde als farb- und helligkeitskodierte Bild miteinander verglichen. Hierzu wurden jeweils Untersuchungen ausgewählt, bei denen sich die Kontrastmittelapplikation besonders gut vornehmen ließ. Die unterschiedliche Durchblutung innerhalb des Tumors lässt sich durch die unterschiedliche Farb- und Helligkeitsverteilung deutlich zeigen.



**Abb. 3.8** Farbkodierte Pixelanalyse. Oben 100mg/kg Cimetidin. Unten Placebo. Die Aufnahmen entstanden nach 20 Tagen Therapie.

Die quantitative Auswertung der dynamischen Messungen stellte, bei sehr kleinen Fallzahlen ( $n = 49$  Messungen insgesamt; 2-9 Messungen / Gruppe\*Messzeitpunkt) und sehr großen Standardabweichungen, ein großes Problem dar. Die Ergebnisse sind für die einzelnen Parameter im Weiteren aufgelistet:

## 2.1 Slope 1

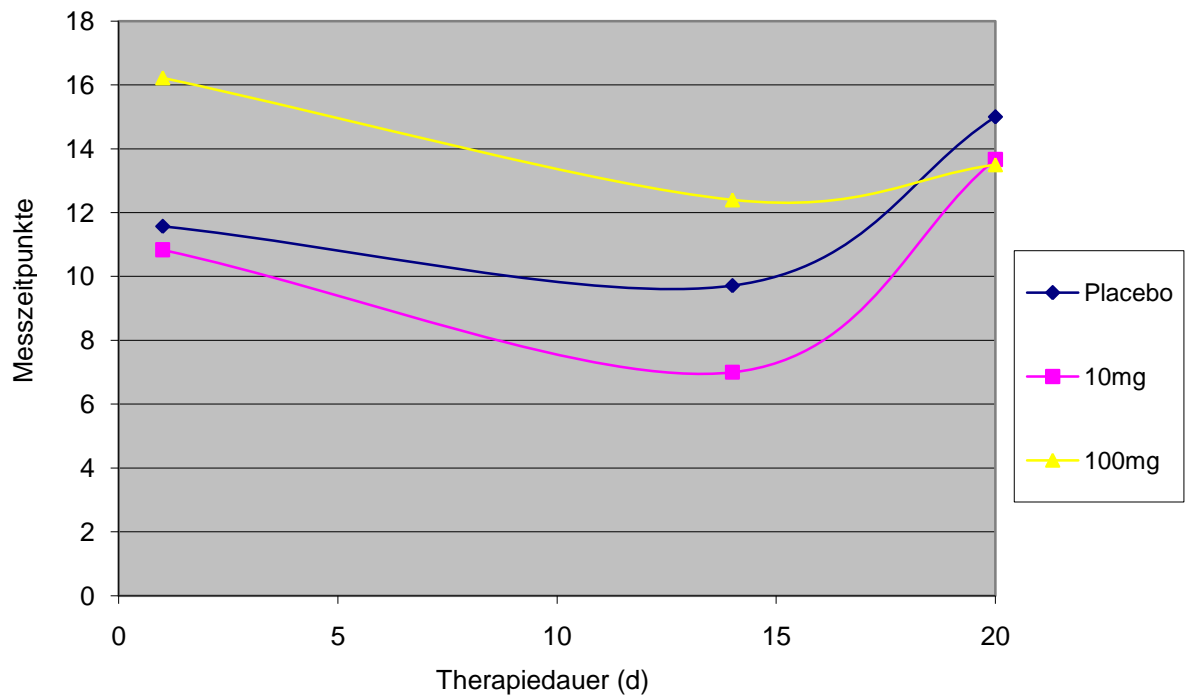


**Abb. 3.9** Die Mittelwerte der Slope 1 Messungen

Die Mittelwerte nach der Messung am ersten Therapietag liegen sehr eng beieinander (10,34 -10,77). Im weiteren Verlauf nehmen die Messkurven einen uneinheitlichen Verlauf. In der Endpunktmessung nach 20 Tagen ist der Mittelwert in der 10 mg/kg Gruppe nahezu konstant geblieben (10,34 nach Tag 1, 9,83 nach Tag 20). In der 100 mg/kg Gruppe und in der Placebogruppe fallen die Mittelwerte ab (Placebo Tag 1 10,77, Tag 20 7,22; 100 mg/kg Tag 1 10,68, Tag 20 7,00).



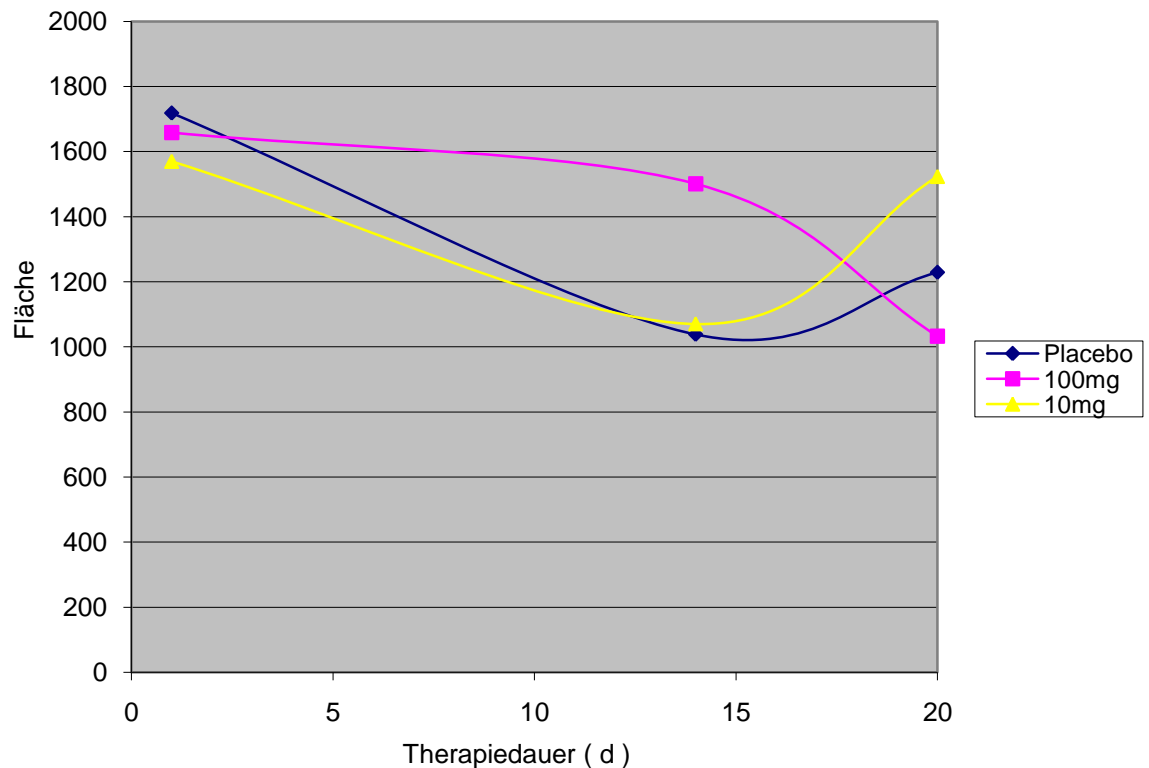
## 2.2 time to peak



**Abb. 3.10** Die Mittelwerte der Time to peak Analyse

In der TTP, der Anzahl der Messintervalle bis zur größten Signalintensität, sollten besser perfundierte Areale schnellere Kontrastmittelanflutungen zeigen und somit früher den Signalpeak erreichen. Es zeigen sich bereits in der 1 Tages-Messung große Schwankungen der Messwerte (7-27) mit entsprechend großen Standardabweichungen (3,35-6,68) und große Unterschiede der Mittelwerte der Gruppen (10,8 - 16,2). Die Messwerte aller Gruppen fallen zunächst ab, um danach wieder anzusteigen. Insgesamt ist die erwartete Tendenz nicht erkennbar.

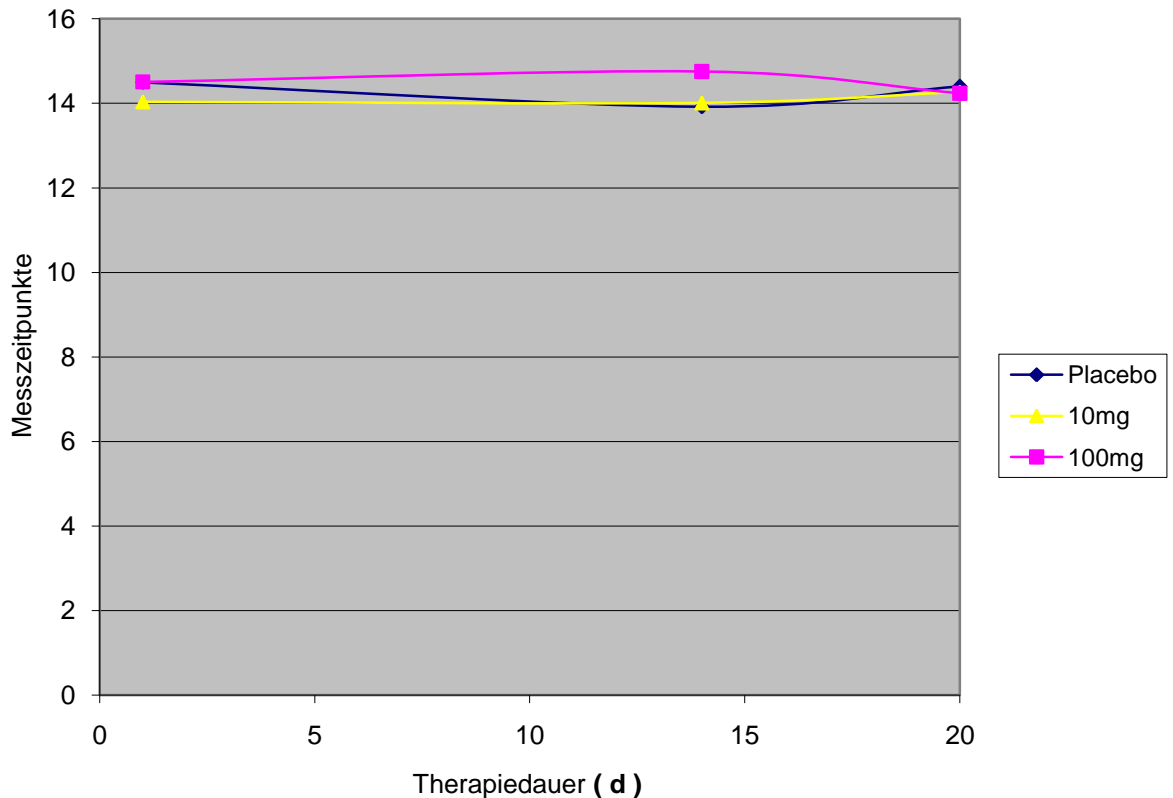
## 2.3 Integral



**Abb. 3.11** Die Mittelwerte der Integral-Analyse

Das Integral stellt die Fläche unter der Kurve der Signalintensität dar. Die Mittelwerte zeigen sich in der ersten Messung eng beieinander (zwischen 1570 und 1719). Am 20. Therapietag liegen sie in allen Gruppen unterhalb des Ausgangswertes jedoch ist in der Reihenfolge, wie in der Grafik ersichtlich, keine Beziehung zur Therapie bzw. Therapiedosierung erkennbar. Am 14. Therapietag waren die Werte der Placebo- und der 10 mg/kg KG Gruppe beide im gleichen Maße gefallen (1038 in der Placebogruppe, 1071 in der 10 mg/kg KG Gruppe) und steigen bis zur 20 Tages Messung wieder an. In der 100 mg/kg KG Gruppe fallen die Werte nach der 14 Tages Messung weiter ab (von 1501 auf 1033). Innerhalb der einzelnen Messgruppen sind die Werte ebenfalls sehr unterschiedlich mit großen Standardabweichungen (zwischen 149 und 699). Es ist keine Tendenz bei der Interpretation der Messwerte erkennbar.

## 2.4 mean transit time



**Abb. 3.12** Die Mittelwerte der mean transit time Analyse

Die MTT entspricht der Fläche unter der Kurve bis zu dem Messpunkt mit maximaler Signalintensität. Die Aussagekraft relativiert sich dadurch, dass sie nur für Einkompartmentgewebe uneingeschränkt angewendet werden kann.

Hier zeigten sich keine nennenswerten Veränderungen zwischen den Gruppen über die Zeit. Alle gemessenen Werte liegen in einem Korridor ohne nennenswerte Steigung zwischen 13,39 und 15,74. Eine Tendenz der Mittelwerte zwischen den Gruppen ist nicht erkennbar. Die Standardabweichungen liegen im Bereich zwischen 0,09 und 0,85.

Insgesamt zeigten die ausgewerteten dynamischen Parameter bei teils starker Streuung keine klaren Tendenzen. Daher wurde auf die Anwendung schließender, statistischer Verfahren verzichtet.

## Diskussion

Das Pankreaskarzinom stellt derzeit trotz aller Bemühungen noch immer eine große Herausforderung für die moderne Medizin mit sehr schlechten Überlebenszeiten für die betroffenen Patienten dar. Die 5-Jahres-Überlebensrate für alle Patienten beträgt in Europa und den USA trotz der intensiven Erforschung möglicher Therapieoptionen nur 4 bis 5% (American Cancer Society, 2008; Robert-Koch-Institut, 1999; Sahani et al., 2008). Den einzigen potentiell kurativen Ansatz stellt nach wie vor die radikale chirurgische Resektion (Wilett et al., 2007; Brunner et al., 2007) dar. Doch auch dieses Verfahren, das aufgrund der relativ langen Symptomfreiheit oder –armut der Erkrankung nur für etwa 15% der Patienten infrage kommt, bringt nur höchstens 30% der Operierten ein rezidivfreies Leben (Benzoni et al., 2007). In den internationalen Bestrebungen die Früherkennung und das Therapiemonitoring dieser und anderer Krebserkrankungen zu optimieren, spielt die Darstellung der Mikrozirkulation im Tumor eine immer größere Rolle (de Bazelaire et al., 2010; Taylor et al., 1999).

Die Entwicklung neuer und Verbesserung bestehender Verfahren und Programme zur Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Rehabilitation von Krebserkrankungen wird nach wie vor weltweit mit großem Aufwand betrieben (Sauer, 1999; Katalinic et al., 2007; Tachezy et al., 2007; Schachter et al., 2007; Piao, 2008). Die Ergebnisse, die im Zusammenhang mit diesen Studien erzielt werden, sind jedoch nicht immer eindeutig oder gar widersprüchlich (Fasola et al., 2007; Sauer, 1999; Mahdevia et al., 2003). Es besteht weitgehende Einigkeit darüber, dass auch in Zukunft ein Ziel der Bestrebungen die weitere Verbesserung geeigneter Instrumente zur Diagnostik sein muss. Hierbei sind vor allem die Bildgebung und die Labordiagnostik die Fokusse des Interesses (Harris et al., 2007; Zhangh et al., 2007; Yu et al., 2007), so konnte Planche erhebliche Fortschritte in der Behandlung des Mammakarzinoms im vergangenen Jahrzehnt durch die Weiterentwicklung auf dem Gebiet

des MRT, Ultraschalls und der Nuklearmedizin beschreiben (Planche et al., 2004).

Die Beurteilung von Tumoren in den bildgebenden Verfahren ist nicht mehr allein auf eine zuverlässigere morphologische Darstellung ausgerichtet. Während früher die wissenschaftlichen Bestrebungen sich in erster Linie auf die alleinige Erkennung von Neoplasien und Messung ihrer Ausmaße konzentrierten, rückt in den letzten Jahren auch immer mehr die Beurteilung der Mikrozirkulation im Tumorbinnenraum in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses. Die Gruppe um Tezelmann konnte beispielsweise die Überlegenheit der dynamischen MRT gegenüber der rein morphologischen und ihre zusätzliche diagnostische Wertigkeit bei insgesamt nicht schlüssigen Untersuchungsergebnissen für das Schilddrüsenkarzinom zeigen (Tezelmann et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Tumolvaskularisation, die direkte Rückschlüsse auf die Vitalität erlaubt, besser geeignet ist, um Therapieeffekte zu quantifizieren, als die bloße Betrachtung der Tumorgößenentwicklung (Barett et al., 2007; Miller et al., 2005). So befasste sich ein Workshop des National Cancer Institute der USA im Jahr 2006 mit der Messung hypoxischer Areale in Tumoren als aufkommendem Fokus der Forschungsbemühungen, da sie Rückschlüsse auf die Vaskularisation und auf das Therapieansprechen erlauben (Tatum et al., 2006).

Ziel der durchgeführten tierexperimentellen Studie war es, die Entwicklung des Tumorumfanges unter Therapie mit Cimetidin im Verlauf genauer zu messen und gleichzeitig die Veränderung der Tumordurchblutung mit Software gestützten Auswertung der Kontrastmittelanflutung (durch die Auswertung des Signalanstiegs in den dynamischen Sequenzen) zu untersuchen. Bei Cimetidin handelt es sich um einen Wirkstoff, dessen klassisches Anwendungsgebiet die Therapie des gastrischen Ulkus ist bzw. war (Bardhan et al., 1980; Blackwood et al., 1976). Erstmals wurde 1979 von Armitage und Sidner ein antiproliferativer Effekt auf das Wachstum von Tumoren durch Cimetidin beschrieben. Im Laufe der Jahre konnte dieser Effekt an verschiedenen Tumoren bestätigt werden, wie z.B. das Ovarialkarzinom (Kikuchi et al., 1985), das Nierenzellkarzinom (Marshall et al., 1987), das maligne Melanom (Harland et al., 1989), das

Kolonkarzinom (Adams et al., 1994; Matsumoto et al., 1995), das Glioblastom (Lefranc et al., 2006) und Speicheldrüsentumore (Fukuda et al., 2007). Dieser Effekt wird auf eine Inhibition der Angiogenese durch das Cimetidin zurückgeführt (Chihara et al., 2009; Natori et al., 2005), wobei die Studienlage hier uneinheitlich und teils kontrovers ist (Sartippour et al., 2003).

Wir verwendeten für die vorliegende Arbeit ausschließlich ein subkutanes Tumormodell auf dem Rücken der Maus. In anderen Studien wurden intrapankreatische (Kleespies et al., 2005), intrapertoneale (Mantell et al., 2006) oder intravenöse (Bruell et al., 2005) Tumormodelle verwendet. Es ist bekannt (Fogh et al., 1977; Bruns et al., 1999), dass sich diese Modelle, z.B. was das Metastasierungsverhalten des Pankreaskarzinoms betrifft, sehr viel mehr wie das Pankreaskarzinom des Menschen verhalten. Dies wird in der Literatur (Tsuzuki et al., 2001; Fidler, 2002) auf die Unterschiede der subkutanen Binnenstruktur im Vergleich zur intraperitonealen pankreatischen Umgebung zurückgeführt. Unterschiede gibt es auch im Wachstumsverhalten. Die subkutanen Modelle wachsen langsamer und sind weniger gut vaskularisiert als orthotope Tumore (Tsuzuki et al., 2001; Bruns et al., 1999). Die gut zugängliche Tumorposition am Rücken der Tiere war allerdings für unsere Kalipermessungen der Tumore, die als vergleichende Methode zur MRT-Volumetrie im Studiendesign vorgesehen war, notwendig. Eine orthotope Implantation der Tumore kam für unsere Studie daher nicht in Frage. Zukünftige Studien könnten jedoch eine MRT-Volumenmessung auch für intraperitoneale Modelle etablieren. Erste Studien konnten bereits den möglichen Stellenwert der dynamischen MRT-Messung in der klinischen Diagnostik des Pankreaskarzinoms zeigen (Birchard et al., 2005; Elsayes et al., 2006).

Ein weiterer entscheidender Punkt bei der Planung der Versuche war die Auswahl der verwendeten Zelllinie. Die verwendete Tumorzelllinie BxPC-3 ist ein in tierexperimentellen Studien zum humanen Pankreaskarzinom sehr häufig verwendetes Tumormodell (Salnikov et al., 2009; Larbouret et al., 2007; Mohammad et al., 2006; Sürücü et al., 2004). BxPC-3 Tumore

haben ein besseres Ansprechen auf antiangiogene Wirkstoffe gezeigt als andere Zelllinien z.B. AsPC-1. Kisker zeigte, dass die Implantation von BxPC-3 als Sekundärtumor das Wachstum gewisser Primärtumore zu unterdrücken vermag (Kisker et al., 2001). Diese Beobachtung wurde als Hinweis auf die Bildung von Inhibitoren des Tumorwachstums durch den Tumor selbst gedeutet. Gestützt wird dies durch die Tatsache das BxPC-3 im Vergleich mit anderen Zelllinien in vitro erheblich schneller wächst als in vivo, während AsPC-1 in vitro und in vivo etwa gleich schnell wächst (Celik et al., 2005). Die Auswahl von BxPC-3 für diese Studie erfolgte mit der Vorstellung, dass durch die bessere Inhibition im Vergleich mit anderen erhältlichen Tumoren die Perfusionsänderungen im MRT deutlicher darzustellen wäre. Der sicherlich interessante Vergleich mit einem aggressiv wachsenden und zur frühen Metastasierung neigenden Tumor wie AsPC-1 wäre ein lohnenswerter zusätzlicher Ansatz gewesen, der jedoch aufgrund der begrenzten Kapazitäten der vorliegenden Studie nicht umzusetzen war.

Neben den dynamischen MRT-Untersuchungen war das zweite wesentliche Ziel der Studie die Volumetrie insbesondere der Vergleich der Methoden. Daten oder Studien über die äußere Form der in Frage kommenden xenograften Tumore lagen nicht vor. Die Zuverlässigkeit der Formeln ist aber ganz entscheidend von der äußeren Form der Tumore abhängig. In den bisherigen Studien im Tiermodell mit manueller Messung wurde überwiegend die von ellipsoiden Tumoren ausgehende Formel ( $V=0,52 \times a \times b^2$ ) verwendet.

Die Therapiesubstanz wurde den Tieren durch eine tägliche subkutane Injektion in die Rückenhaut der Mäuse in Distanz zum Tumor verabreicht. Die Injektion erfolgte abwechselnd auf der rechten und der linken Seite. Die Cimetidin-Zufuhr erfolgte also als täglicher, systemischer Bolus. In anderen Arbeiten am Mausmodell mit antiangiogenen Substanzen, wie z.B. von der Arbeitsgruppe um Schmidt in einer Studie zum Glioblastom (Schmidt NO et al., 2004), wurde der Wirkstoff intratumoral verabreicht. Die vorliegende Arbeit sollte jedoch bewusst eine systemische und keine lokale Tumorthherapie überwachen, obwohl mit der intratumoralen Injektion höhere Wirkstoffspiegel zu erzielen gewesen wären. Wir starteten die

Therapie bei einem gemessenen Tumolvolumen von 0,1 ml. Die Arbeit von Achilles zeigte, dass ein Tumor nur dann diese Größe erreichen kann, wenn er ein eigenes System der Gefäßversorgung entwickelt hat, an deren weiterem Wachstum die Therapie ansetzen sollte (Achilles et al., 2001).

Eine Vielzahl von Methoden zur Untersuchung der Angiogenese und Volumetrie im Tumormausmodellen wie z.B. endoskopischer Ultraschall (Kraaij et al., 2002), Rückenhautkammer (Hardee et al., 2007), abdominelle Fensterung (Tsuzuki et al., 2001) oder PET (Cai et al., 2006) sind bereits verwendet worden. Wir entschlossen uns neben der Kernspintomografie eine manuelle Messung der Tumorausdehnung durchzuführen, da diese immer noch die am häufigsten angewandte Methode der repetitiven Tumervolumetrie in Tierversuchen ist und trotz der theoretischen und praktischen Probleme als Goldstandard anzusehen ist.

Die Beurteilung des Ansprechens auf nichtchirurgische Therapien bösartiger Tumore wie Radiatio, Chemotherapie oder nuklearmedizinische Therapien ist eine der Herausforderungen, der sich die moderne Radiologie immer wieder stellen muss (Bhattacharyya et al., 2008; Rockall et al., 2007; Flaherty et al., 2008). Im konventionellen Röntgenbild steht hierzu lediglich die einfache Bestimmung des Durchmessers sichtbarer Tumore im zweidimensionalen Bild zur Verfügung. Ein Verfahren, das in der Medizingeschichte sicherlich früher einmal einen gewissen Stellenwert hatte, heute aufgrund der Vielzahl besserer Methoden jedoch höchstens noch im Einzelfall Anwendung findet. Ultraschalluntersuchungen sind differenzierter zu betrachten. Ihnen sind nur bestimmte Körperregionen wie beispielsweise Leber oder Brust zugänglich, zwar hat es auch hier durch die Einführung neuer Verfahren in den letzten Jahren und Jahrzehnten wie der endoskopischen Sonografie (Strohm et al., 1984; von Lilienfeld-Toal et al., 1985) oder der Sonografie mit Kontrastmitteln (Gramiak et al., 1969; Schliep et al., 1996) und der stetigen Verfeinerung der Technik Verbesserung gegeben, doch bleibt das Einsatzfeld der Methode nach wie vor beschränkt. Die sichere Durchführung und Beurteilung ist auch bei guten Bedingungen nur durch einen erfahrenen



Sonografeur möglich und für die zuverlässige Verlaufskontrolle sollte dieser nicht wechseln. Nichtsdestotrotz ist dies eine Methode, die in ihrem Indikationsspektrum eine Orientierung über die Therapietendenz geben kann (Schafer et al., 1996). Die anhaltenden Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der Ultraschallvolumetrie, z.B. auch im Bereich der kardiologischen Sonografie (Lino et al., 2007), könnten das Spektrum in Zukunft weiter festigen oder noch erweitern.

Anerkanntermaßen sind es jedoch die Schnittbildverfahren CT und MRT, die zur radiologischen Beurteilung des Therapieerfolges am besten geeignet sind. Sie bieten die sicherste Abgrenzung des Tumors vom nicht erkrankten Gewebe in allen Körperregionen und erlauben somit die zuverlässigste Einschätzung des Wachstumsverhaltens.

Bestrebungen die Vergleichbarkeit von Studien, die das Wachstumsverhalten von Tumoren untersuchen, zu verbessern, reichen bis in die 60er Jahre des 20. Jahrhunderts zurück (Gehan et al., 1990; Zubrod et al., 1960). Im Jahr 1979 veröffentlichte die WHO Kriterien zur standardisierten Kategorisierung, die für lange Zeit allgemeine Gültigkeit behielten.

Diese Kriterien basierten auf zwei senkrecht aufeinander stehenden Durchmessern, deren Produkt im zeitlichen Verlauf betrachtet und in vier Kategorien eingeteilt wurde:

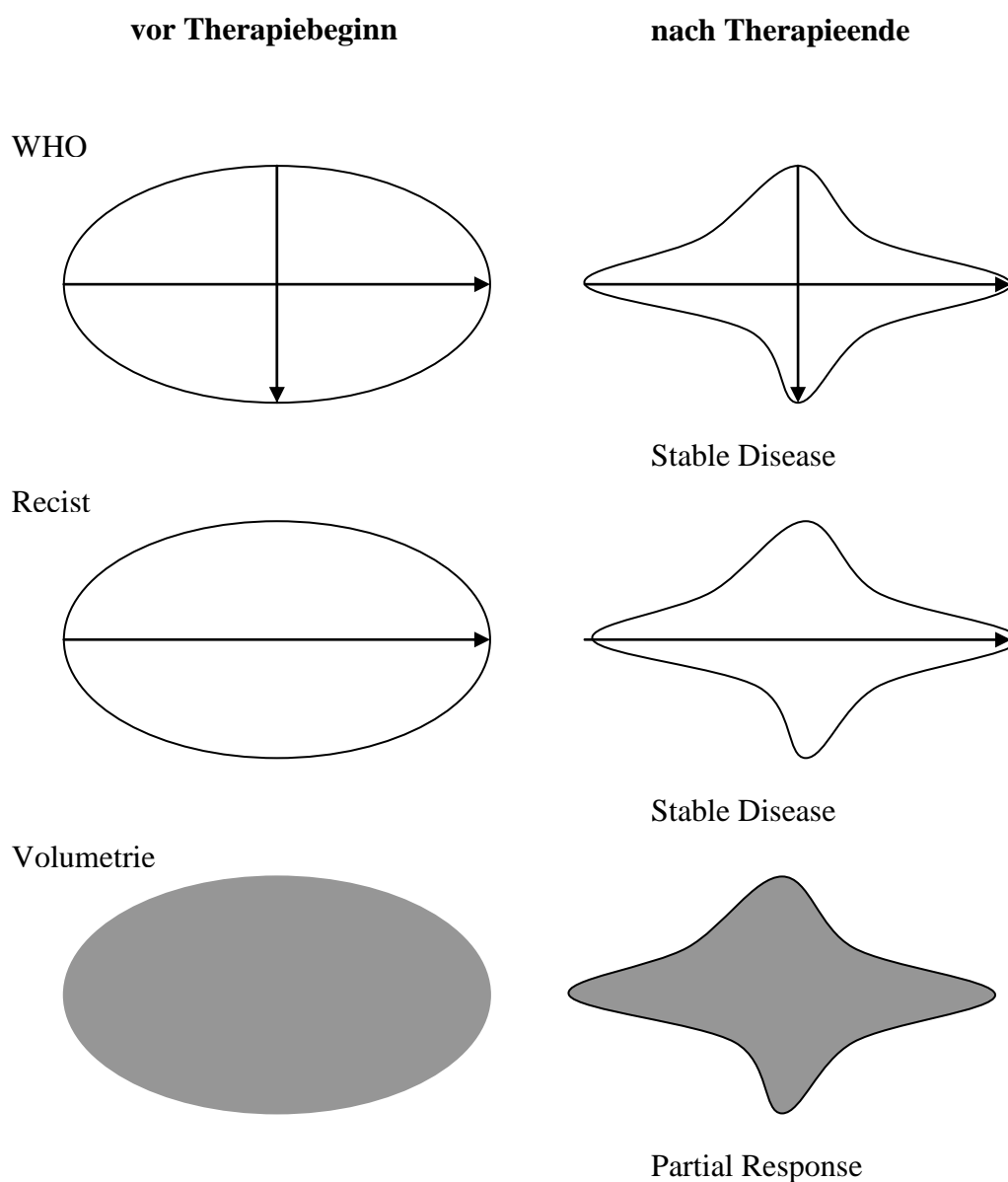
- ♦ Complete Response (CR): Nach der Therapie ist der Tumor nicht mehr nachweisbar,
- ♦ Partial Response (PR): Das Produkt der Durchmesser hat sich um mindestens 50% reduziert,
- ♦ Stable disease (SD): Das Produkt bewegt sich zwischen 50% Reduktion und 25% Progression,
- ♦ Progressive disease (PD): Das Produkt hat um mehr als 25% zugenommen.

Die dreidimensionale Analyse des Tumolvolumens war zum Veröffentlichungszeitpunkt technisch noch keine praktikable Alternative und fand daher keinen Eingang in die Kriterien. Mit zunehmender Verbreitung der Schnittbildgebung wurde dies immer mehr zum

Schwachpunkt. Verschiedene Probleme der WHO-Kriterien, wie z.B. die Frage, ob einzelne Läsionen oder die gesamte Tumorlast als Untersuchungsobjekt verwendet wird, führte im Laufe der Jahre zu verschiedenen Interpretationen und mehreren Modifikationen, so dass die Vereinheitlichung unterschiedlicher Studienergebnisse mit der Zeit wieder relativiert wurde. Im Jahr 2000 wurden dann neue Kriterien als Kooperation der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), des National Cancer Institute (NCI) der USA und des National Cancer Institutes Kanadas festgelegt. Diese neuen Kriterien wurden Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) (Therasse et al., 2000) genannt. Die neuen Kriterien sollten sich so wenig wie nötig von der alten WHO-Einteilung unterscheiden, um eine Vergleichbarkeit mit älteren Studien weiterhin zu gewährleisten. Zu diesem Zweck sollte die ursprüngliche Einteilung des Krankheitsverlaufs mit ihren vier Kategorien beibehalten werden. Die wesentliche Neuerung bestand darin, dass nicht mehr zwei Durchmesser, sondern nur noch der längste Durchmesser für die Verlaufskontrolle zu Grunde gelegt wurde. Die Auswertung von 14 Studien mit insgesamt fast 600 Patienten, die für die neuen Kriterien gemacht wurden, zeigte, dass diese Veränderung möglich ist, aber eine Anpassung der Kriterien der Kategorisierung notwendig machte (James et al., 1999). Der Schwellenwert für die partial response (PR) wurde von -50% auf -20% und der für die progressive disease von +25% auf +20% geändert. Die genannten Klassifikationen sind jedoch zur Beschreibung der von uns untersuchten Tumore nicht geeignet. Der von uns beobachtete Therapieeffekt bewegte sich zwar im Bereich einer mathematisch signifikanten Wachstumsinhibition, das Tumorstadium betrug aber in den MRT-Messungen in der hoch dosierten Therapiegruppe noch mehr als +200%.

Die genaueste und somit verlässlichste Methode der Volumenmessung als Indikator des Therapieansprechens ist aber die dreidimensionale Volumenmessung. Die kontinuierlich steigende Verfügbarkeit von MRT und CT in Forschung und Klinik lässt diese Methode immer weiter in den Vordergrund treten.

Die folgende Abbildung veranschaulicht ein Beispiel, in dem in einer 2-dimensionalen Darstellung eine tatsächliche Regression des Tumervolumens um ca. 50 % in den WHO- und Recist-Kriterien nicht abgebildet wird. Der wahre Therapieeffekt ist nur in der Messung des Tumervolumens zuverlässig abgebildet. Es sind aber auch Szenarien möglich, in denen die manuellen Messmethoden, wie in unserer Studie im Vergleich zur MR-Volumetrie geschehen, das Tumervolumen unterschätzen und es somit ebenfalls zu einer Fehleinschätzung des Therapieerfolges kommt.



Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Ergebnisse der Volumenermittlung mit 2- und 3-dimensionalen Methoden miteinander zu vergleichen.

Hierzu wurden die manuellen Methoden mit Kalipermessung und Volumenberechnung mit der Formel ( $V=a^2 \times b \times 0,52$ ) und unserer modifizierten Formel ( $V=4/3 \times \pi \times (a/2 \times b/2)^{3/2}$ ) mit der Volumenberechnung aus 3D-MRT-Sätzen verglichen. Eine Auswertung mit den WHO- und RECIST-Kriterien fand nicht statt.

Die von uns gefundenen Volumendifferenzen bei großen Tumoren stimmen mit denen einer vergleichbaren Studie (Cornelissen et al., 2005) überein. In der Studie von Cornelissen werden allerdings nur nicht therapierte Tumore des Kolonkarzinoms HT29 untersucht. Wir kamen also zu vergleichbaren Ergebnissen bei etwas unterschiedlichem Studiendesign. Die mechanische Messung geht von einer ellipsoiden Form aus, so dass annähernd ellipsoid wachsende Modelle besser mit dieser Methode zu untersuchen sind. Diese Methode wurde in mehreren vergleichbaren Studien verwendet (z.B O'Reilly et al., 1998; Kisker et al., 2001). Die persönliche Erfahrung hat jedoch gezeigt, dass die Tumormorphie mit zunehmendem Wachstum immer mehr von diesem Ideal abweicht. Dies wird durch den Vergleich der Messmethoden miteinander auch indirekt bestätigt (gute Übereinstimmung in den ersten Messungen, schlechtere später).

Die Untersuchung des Wachstums erfolgte an einer Placebo-Gruppe sowie zwei Therapie-Gruppen unterschiedlicher Cimetidin-Konzentration (10mg/kg KG und 100mg/kg KG). Es zeigte sich durchweg in allen Messmethoden eine deutliche lineare Dosis-Wirkungsbeziehung. In der vorhergehenden Untersuchung von Sürürcü et al., die dieselben Zelllinien verwendete, wurde lediglich mit 100 mg/kg KG therapiert. Die Inhibition in den Messungen nach 20 Tagen zeigte in unserer und in der Sürürcü Studie eine gute Übereinstimmung (66% zu 67% Inhibition). Auch in der Arbeit von Tomita et al., 2003, die einen wachstumshemmenden Effekt von Cimetidin auf xenograft humane Kolontumore in Mäusen zeigen konnten, wurde eine Dosis- Wirkungsbeziehung nicht untersucht. Tomita konnte eine Inhibition von 52 % nach 26 Tagen zeigen. Die Ergebnisse

sind allerdings nicht vergleichbar, da hier die Kolonkarzinomzelllinie Colon 38 anstatt unserer Pankreaskarzinomzellen BxPC3 verwendet wurde. Die Dosis war mit 200mg/kg KG Cimetidin doppelt so hoch wie in der vorliegenden Studie.

Im Gegensatz zu den mit 100 mg/kg KG therapierten Tumoren konnte bei den mit 10 mg/kg KG therapierten keine mathematisch signifikante Inhibition nachgewiesen werden. Eine Tendenz war jedoch erkennbar, so dass bei höheren Fallzahlen eventuell eine signifikante Wachstumsinhibition nachweisbar sein könnte. Dies wäre durch eine nachfolgende Studie mit größerer Fallzahl zu klären.

Obwohl die proliferationshemmende Wirkung von Cimetidin auf einige Tumore bereits seit 1979 bekannt ist (Armitage et al., 1979), und auch in jüngerer Vergangenheit zahlreiche Studien diesen Effekt untersucht haben (z.B. Sürücü et al., 2005; Fujikawa et al., 2007; Fukuda et al., 2007), war dies unseres Wissens nach die erste Studie, die das Wachstumsverhalten der Tumore mit wiederholten MRT-Untersuchungen überwachte und die Ergebnisse mit denen der manuellen Messung verglich. In unserer Studie beobachteten wir eine gute Übereinstimmung der unterschiedlichen Ergebnisse miteinander bei kleinen Volumina. Bei Tumorumfängen über 200 mm<sup>3</sup> zeigte sich eine linear verlaufende Unterschätzung der mechanisch ermittelten Tumorumfänge im Vergleich mit den im MRT separierten Volumina, wenn die Formel  $(a^2 \times b \times 0,52)$  verwendet wurde. Dieser Trend zeigte sich ebenfalls in der Studie von Cornelissen et al., 2005. Wir entwickelten eine eigene Formel  $(V = 4/3 \times \pi \times (a/2 \times b/2)^{3/2})$ , mit der diese bei großen Tumoren beobachteten Unterschiede zwischen den errechneten Volumina nicht mehr in diesem Maße vorkamen. Die Herleitung der Formel findet sich im Anhang dieser Arbeit. Unsere Formel zeigte auch eine bessere Übereinstimmung, wenn alle Ergebnisse in den Vergleich miteinbezogen wurden.

Neben der Messung der Volumenentwicklung war das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Gefäßdichte im Tumor durch softwarebasierte Auswertung dynamischer MRT-Sequenzen.

Ein verbessertes Monitoring der Effektivität von Tumorthherapie, das nicht-invasiv Veränderungen aufzeigen kann und sich dabei nicht auf die Regression der Tumorgroße oder die Bildung intratumoraler Nekrosebezirke bezieht, ist die indirekte Überprüfung der Gefäßdichte auf Basis von dynamischen kontrastmittelverstärkten Kernspintomografie-Sequenzen. Die Kernspintomografie bedient sich hier der besonderen Eigenschaften von Tumorgefäßen. Sie weisen im Vergleich mit Gefäßen in gesundem Gewebe einen veränderten Blutfluss, andere Gefäßdichte und Kaliber sowie eine erhöhte Wandpermeabilität auf. Dynamische MRT-Sequenzen mit nicht zellgängigen Kontrastmitteln sind geeignet diese Unterschiede darzustellen, wie beispielweise die Arbeitsgruppe um Taylor zeigen konnte (Taylor et al., 1999). Als Alternative wurde in anderen Studien die Vaskularisation im MRT ohne den Einsatz von Kontrastmitteln gemessen. Für diese „Arterial Spin Labeling“ genannte Technik (Detre et al., 1992) wird der arterielle Zustrom in das zu messende Areal direkt gemessen. Hierzu wird das im Blut enthaltene Wasser als endogenes Kontrastmittel in T1-Sequenzen verwendet. Dieses Verfahren verwendete z.B. Tempel-Brami zur nicht-invasiven Messung der Perfusion und Angiogenese in Ovarien von Ratten (Tempel-Brami et al., 2002; Tempel, 1999).

Eine Korrelation zwischen dynamischen MRT-Sequenzen und Histologie in Bezug auf tumorspezifische Eigenschaften konnte bisher bereits unter anderem für Hirntumore (Roberts et al., 2001), Lungentumore (Schaefer et al., 2006), Brustkrebs (Nagashima et al., 2006), Leberzellkarzinome (Wang et al., 2005) und Prostata-Karzinome (Villers et al., 2006) gezeigt werden. Dieses Verfahren bedient gleich eine Reihe von Forderungen zur Verbesserung von Forschung und Therapie, die in den letzten Jahren laut geworden sind. Insbesondere da ein nicht unerheblicher Teil der Krebsforschung der letzten Jahre eben die Unterdrückung der Gefäßneubildung von Tumoren als vielversprechenden Ansatzpunkt entdeckt hat (Petersen et al., 2007), müssen entsprechende Verlaufskontrollen etabliert werden. Die Möglichkeit repetitive Messungen durchzuführen und so einen Überblick über Veränderungen der Gefäßdichte im Verlauf zu erlangen, ist ein ganz elementarer Vorteil, da

sie zusätzliche Informationen zur Dynamik der Tumorentwicklung liefern kann. Die Methode der immunhistochemischen Untersuchung liefert zwar noch genauere Ergebnisse, eignet sich aber naturgemäß nur als Endpunktsanalyse und wird somit der Dynamik der untersuchten Methoden, die oftmals multimodalen Ansätzen folgen, nicht ausreichend gerecht. Die möglichen Anwendungsgebiete erstrecken sich jedoch auch über wissenschaftliche Ansätze hinaus auf den klinischen Alltag. Die Medizin ist heute noch mehr als in der Vergangenheit wirtschaftlichen Zwängen unterworfen (Statistisches Bundesamt 2002). Eine schnelle und effektive Qualitätskontrolle der in der Regel sehr teuren antiangiogenen Therapien bietet die Option, bei Therapieversagern frühzeitig abubrechen oder auf einen anderen Ansatz zu wechseln. Dies ermöglicht es, erhebliche Kosten für das Gesundheitswesen und unter Umständen den einzelnen Patienten, die keinen therapeutischen Benefit bringen, zu vermeiden. Darüber hinaus profitiert der Patient, indem ihm mögliche Nebenwirkungen einer erfolglosen Therapie durch das schnelle Ende der Medikamentenapplikation erspart bleiben.

Bei der Analyse der pixelbasierten Falschfarben- und Helligkeitsanalyse ließen sich in einigen Fällen deutliche Veränderungen der Perfusion unter der Therapie im Vergleich zu den nicht therapierten Tieren beobachten.

Die quantitative Analyse des Verlaufs der Signalstärke, im Einzelnen die der im Ergebnisteil beschriebenen Parameter, konnte jedoch keine konklusiven Ergebnisse liefern.

Für den Parameter Slope 1, der die Steigung der Messkurve bis zum höchsten Punkt darstellt, wurde erwartet, dass die Werte am ersten Therapietag dicht beieinander liegen. Dies ließ sich in der ersten Messung auch tatsächlich zeigen. Im Verlauf der Therapie sollte die Gefäßdichte in der Placebogruppe größere Werte annehmen, als in den Gruppen mit antiangiogene Therapie. Da eine höhere Gefäßdichte, bei vergleichbarem Durchmesser der Kapillaren, eine verbesserte Perfusion bedeutet, war demzufolge eine raschere Anreicherung des Kontrastmittels im Tumorgewebe in der Placebogruppe zu erwarten. Die Wandbeschaffenheit der Tumorgefäße, die ja im Vergleich zu physiologischen Gefäßen „undichter“ für größere Moleküle sind, führt

ebenfalls zu einer stärkeren und schnelleren Anreicherung von Kontrastmittel im Tumorgewebe. Die Auswertung der Messwerte der vorliegenden Studie konnte leider keine derartigen Ergebnisse zeigen. Die Werte könnten darauf hindeuten, dass die Steigung generell mit wachsendem Tumor eher flacher wird. Die Erklärung hierfür könnte in dem Umstand liegen, dass die Blutversorgung eines Tumors nicht mit einem gesunden Organ zu vergleichen ist. Die pathologisch „undichten“ Gefäße erhöhen den Gewebedruck im Tumor, dies erschwert eine ausreichende Perfusion bei steigendem Volumen zusehends, es kommt zu zentralen Nekrosezonen, die im MRT kaum Kontrastmittel aufnehmen. Die ROIs wurden allerdings in die peripheren Regionen des Tumors gelegt, um bei ungleichgroßen Tumoren diese Einflüsse zu minimieren.

In der TTP, der Anzahl der Messintervalle bis zur größten Signalintensität, sollten besser perfundierte Areale schnellere Kontrastmittelanflutungen zeigen und somit früher den Signalpeak erreichen. Aus den gewonnenen Werten lassen sich keine klaren Tendenzen ableiten. Die TTP ist jedoch ein Wert der besonders störanfällig ist, da bei noch ansteigender oder bereits wieder absteigender Kurve Ausreißer häufig sind, die einen Peak vortäuschen können.

Der Parameter Integral beschreibt die Fläche unter der Messkurve. Wir erwarteten, dass dieser Wert bei den nicht therapierten Mäusen größere Werte annimmt als bei den therapierten. Die Fläche unter der Kurve sollte mit dem Kontrastmitteleinstrom in den Tumor korrelieren, der unter Therapie bei niedrigerer Gefäßdichte und somit geringerer Durchblutung ebenfalls geringer erwartet wurde als bei den nicht therapierten. In den erzielten Messergebnissen lässt sich keine Tendenz erkennen.

Die MTT ist die Fläche unter der Kurve bis zu dem Messzeitpunkt mit der größten Signalintensität. Hier verliefen die Messkurven in einem schmalen Korridor eng beieinander, ohne sich wesentlich im Laufe der Therapie zu verändern. Auch mit diesem Parameter konnte kein Therapieeffekt dargestellt werden.

Insgesamt konnten die erwarteten Therapieeffekte mit keinem der dynamischen Parameter dargestellt werden. Die Gründe könnten darin begründet liegen, dass sich die bei der Planung veranschlagten



Gruppengrößen als zu klein erwiesen. Die sichere intravasale Bolus-Applikation des Kontrastmittels führte zu technischen Problemen und bei den Messungen im Therapieverlauf kam es vermehrt zu Schwanznekrosen, was die Punktion einer Schwanzvene zusätzlich erschwerte. Während die unerkannte Fehlpunktion bereits in der Studie von Alfke (Alfke et al., Rofo, 2004) vorgekommen waren, handelte es sich bei der Schwanznekrose um ein bisher nicht bekanntes Problem. Unserem Wissen nach ist dies auch in der Literatur noch nicht beschrieben.

Diese Studie verfolgte folgende Ziele:

1. Die Änderungen der Gefäßdichte xenografter Pankreaskarzinome in Mäusen unter Therapie mit Cimetidin durch funktionelles MRT darzustellen und zu quantifizieren. Die durchgeführten Untersuchungen konnten leider keine verwertbaren Ergebnisse liefern. Das entscheidende Hemmnis bei der Datengewinnung war die unsichere Bolusapplikation des Gadoliniums. Ein möglicher Lösungsansatz wäre eine Wiederholung der Studie mit größeren Tieren, denen sich ein zuverlässiger venöser Zugang legen lässt.
2. Der Vergleich der Volumenbestimmung der Tumore mit manueller Messung und anschließender Volumenberechnung mit zwei verschiedenen Formeln mit der softwaregestützten Volumenermittlung aus 3-dimensionalen MRT-Bildern. Unabhängig von der verwendeten Methode konnte eine Inhibition nach 20 Tagen gezeigt werden, die in der 100 mg/kg jeweils statistisch signifikant war. Es zeigte sich eine bessere Korrelation der aus den MRT-Sequenzen ermittelten Volumina mit unserer neu entwickelten Formel als mit der althergebrachten.

Die Forschungen auf dem großen Gebiet der Antiangiogenese, die an vielen unterschiedlichen Punkten der Gefäßneubildung mit einer großen Anzahl von Substanzklassen zur Heilung einer ganzen Reihe verschiedener Tumorerkrankungen anzusetzen versucht, lassen für die

Zukunft auf wirksame Verbesserungen in der Therapie hoffen. Unsere Studie konnte einen Teil dazu beitragen, den lange bekannten Effekt von Cimetidin auf Pankreastumore genauer quantitativ zu beschreiben. Eine indirekte Untersuchung der Gefäßdichte war mit unserer Methode nur in Einzelfällen in der semiquantitativen Analyse möglich, hier müssten nachfolgende Studien mit geeigneteren Methoden ansetzen.

Die Durchführung von MRT-Untersuchungen zur Überwachung von Tumorthérapien wird wegen des den konkurrierenden Methoden gegenüber oftmals höheren Informationsgehalts und der immer weiter steigenden Verfügbarkeit der Scanner im ambulanten und stationären Bereich weiter an Bedeutung gewinnen. Die Etablierung von geeigneten Untersuchungsverfahren, wie dem in dieser Studie angewandten, trägt somit zur Verbesserung einer wichtigen Säule in der Versorgung Krebskranker bei. Auch wenn im Vergleich zu früher die reine Ausdehnung von Tumoren nicht mehr der einzige und mitunter auch nicht mehr der primäre Zielpunkt in der Auswertung bildgebender Untersuchungen ist, wird die Volumenbestimmung auf absehbare Zeit ein wichtiges diagnostisches Instrument bleiben. Auch für die Planung von Organteilresektionen, z.B. in Leber oder Lunge, hat sich die 3D-Volumetrie als hilfreiches Instrument erwiesen. So konnte Chun eine Erweiterung der Indikation für kurative Therapien bei hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen durch eine Weiterentwicklung im multimodalen Therapiekonzept in den letzten zehn Jahren zeigen. Die präoperative CT-Volumetrie ist ein wichtiger Bestandteil dieser Verbesserung (Chun et al., 2007).

Für die adjuvante Chemotherapie des Pankreaskarzinoms ist derzeit die Monotherapie mit Gemcitabine der Standard, sie wird derzeit noch von den Fachgesellschaften empfohlen, z.B. in der aktuellen Leitlinie der AWMF (Seufferlein et al., 2009), ihre Daseinsberechtigung wird auch in der Übersichtsarbeit von Wisinski bestätigt (Wisinski et al., 2007). Gemcitabine ist ein Pyrimidinanalogon, das, in die DNS eingebaut, den Zellzyklus zwischen der G1- und S-Phase stoppt und so die Apoptose auslöst (Lüllmann et al., 2006). Es hat somit keinen unmittelbaren Einfluss

auf die Neubildung von Tumorgefäßen. Erste Studien zeigen jedoch Verbesserungen in der Überlebenszeit, wenn eine Kombitherapie mit einem Angiogenesehemmer verwendet wird. Die Studien mit dem EGFR Antagonisten Erlotinib (Tarceva®) sind inzwischen soweit fortgeschritten, dass Erlotinib/Gemcitabine als Kombination für die First-Line-Therapie von der US-Amerikanischen Zulassungsbehörde zugelassen wurde (Senderowicz et al., 2007) und auch in der deutschen S3 AWMF-Leitlinie für die palliative Chemotherapie mittlerweile als mögliche Alternative zur Gemcitabine Monotherapie erwähnt wird.

Die anhaltenden Forschungsaktivitäten, nicht zuletzt auf dem Gebiet der Kernspintomografie und Antiangiogenese, lassen in Zukunft weitere Verbesserungen in der Therapie des in dieser Studie untersuchten Pankreaskarzinoms und auch anderer Tumorerkrankungen erwarten und erhoffen.

# Zusammenfassung

Trotz weltweiter wissenschaftlicher Bestrebungen hat sich die schlechte Überlebensrate des Pankreaskarzinoms bisher nicht wesentlich verbessern lassen können. Erfolge in der Tumordiagnostik konnten in den letzten Jahren durch neue bildgebende Verfahren der Volumetrie, insbesondere der dreidimensionalen, sowie der dynamischen Bildgebung beispielsweise zur Darstellung der Durchblutung von Tumoren erzielt werden. Die Visualisierung der Durchblutung und Gefäßdichte ist deswegen ein interessanter Ansatz, da die Angiogenesehemmung ein neues therapeutisches Paradigma in der Tumorthherapie darstellt und Therapieansprechen hier mit den gängigen morphometrischen Kriterien nur sehr eingeschränkt dargestellt werden kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den seit langem bekannten anti-angiogenen Effekt des Histamin-Antagonisten Cimetidin, auf ein subkutan in immundefizienten SCID-Mäusen implantiertes menschliches Pankreaskarzinommodell (BXPC-3) mittels dynamischer MRT und MRT-Volumetrie zu untersuchen.

Immundefizienten SCID Mäusen wurde zwischen den Schulterblättern subkutan ein humanes Pankreaskarzinommodell implantiert. Die Tiere wurde in drei Gruppen (Placebo, 10mg Cimetidin/kg und 100 mg Cimetidin/kg) randomisiert und wiederholten mechanischen (Kalipermessungen der Tumorgroße) und MR-basierten Messungen unterzogen. Die MRTs erfolgten in einer speziell entwickelten Kleintierspule. Ziel der dynamischen MRT-Untersuchung war es, die Mikrozirkulation im Tumor, d.h. die Perfusion und Perfusionsverteilung im Rahmen quantitativer Auswertung von Anreicherungskurven und pixelbasierter Falschfarbendarstellung zu untersuchen. Hierzu wurde eine neu entwickelte Software-Plattform verwendet. Die MRT Volumetrie erfolgte mit einem Tool, das auf einer interaktiven Wasserscheiden Transformation beruht, einer neuartigen Methode zur effektiven

Bearbeitung multidimensionaler Graustufenbilder. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich mit einer manuellen Tumormessung verglichen. Für die manuelle Messung verwendeten wir eine etablierte sowie eine selbst entwickelte Formel. Wir modifizierten die bestehende Formel so, dass längliche Tumore nicht mehr im bisherigen Ausmaß in ihrem Volumen unterschätzt werden.

Insgesamt wurden 27 Tiere untersucht, die Therapie- bzw. Untersuchungsdauer betrug 20 Tage. Es wurden 72 MRT Untersuchungen durchgeführt. Die Softwareanalyse der Daten dauerte pro Datensatz ca. 15 Minuten. Es konnte mit allen drei verwendeten Methoden der Volumenbestimmung gezeigt werden, dass ein dosisabhängiger Therapie-Effekt im Sinne einer Wachstumsinhibition besteht. Es konnte im Gegensatz zu vorhergehenden Studien anhand zweier unterschiedlicher Therapiegruppen eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden. Die Wachstumsinhibition wurde im Vergleich zu vorhergehenden Studien erstmals mittels einer MRT-Untersuchung überwacht. Die Methoden korrelierten gut miteinander, jedoch stimmten die mittels der 3-D-Volumetrie ermittelten Werte besser mit der von uns entwickelten Formel als mit der etablierten überein, wenn die Tumore größer als 200mm<sup>3</sup> wurden. Die dynamischen MRT-Untersuchungen konnten in der pixelbasierten Falschfarbenanalyse qualitative Veränderungen aufzeigen, die wir auf eine veränderte Durchblutung als Folge der Therapie zurückführten, es konnten also aus den Bildern indirekte Rückschlüsse auf die Gewebedurchblutung und somit auf die Gefäßdichte gezogen werden. Die quantitative Auswertung der Anreicherungskurven lieferte bei kleinen Gruppengrößen keine konklusiven Ergebnisse.

Mit der durchgeführten Arbeit konnte ein nicht-invasives Therapiemonitoring mit Hilfe einer neuen Software-Plattform etabliert werden. Eine solche Plattform stellt ein wertvolles Werkzeug einer exakten Diagnostik und Therapieüberwachung auch für nicht oberflächliche Tumoren dar. Aus klinischer Perspektive ließen sich mit solchen Methoden frühzeitige antiangiogene Effekte nachweisen und ggf. ein wirtschaftlicherer Einsatz sehr kostspieliger Therapien erzielen.

# Literaturverzeichnis

1. "Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland" Robert Koch Institut, 1999
2. Abe N, Sugiyama M, Atomi Y, Gan To Kagaku Ryoho. Recent important insights into treatment of pancreatic cancer. 2005 May;32(5):617-23
3. Achilles E-G, Fernandez A, Allred EN et al. Heterogeneity of angiogenic activity in a human liposarcoma. J National Cancer Institute 2001;93:1075-81
4. Adair TH, Gay WJ, Montani J-P. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis; Am Journal Physiol 1990;258:R393-R404
5. Adams WJ, Lawson JA, Morris DL. Cimetidine inhibits in vivo growth of human colon cancer and reverses histamine stimulated in vitro and in vivo growth. Gut. 1994 Nov;35(11):1632-6.
6. Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM, Lutz MP, Micke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag PM, Schmid R, Schmiegel W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I. [S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007] Z Gastroenterol. 2007 Jun;45(6):487-523.
7. Aigner A, Butscheid M, Kunkel P, Krause E, Lamszus K, Wellstein A, Czubayko F. An FGF-binding protein (FGF-BP) exerts its biological function by parallel paracrine stimulation of tumor cell and endothelial cell proliferation through FGF-2 release. Int J Cancer. 2001 May 15;92(4):510-7.
8. Alfke H, Kohle S, Maurer E, Celik I, Rascher-Friesenhausen R, Behrens S, Heverhagen JT, Peitgen HO, Klose KJ. Analysis of mice tumor models using dynamic MRI data and a dedicated software platform\*.Rofo. 2004 Sep;176(9):1226-31.

9. Algire GH, Chalkely HW, Legallais FY, Park H. Vascular reaction of normal and malignant tumors in vivo: I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Nation Cancer* 1945;6:73-85
10. Algire GH, Legallais FY. Growth rate of transplanted tumors in relation to latent period and host vascular reaction. *Cancer Res*, 1947;7:724
11. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures*, 200; 17.
12. Armitage JO, Sidner RD. Antitumor effect of cimetidine. *Lancet* 1979;1:882-3
13. Atkins MS, Mackiewicz BT. Fully automatic segmentation of the brain in MRI. *IEEE Trans Med Imaging*. 1998 Feb;17(1):98-107
14. Aussprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Mikrovasc Research* 1977;15:53-65
15. Barrett T, Brechbiel M, Bernardo M, Choyke PL. MRI of tumor angiogenesis. *J Magn Reson Imaging*. 2007 Aug;26(2):235-49. Review.
16. de Bazelaire C, Calmon R, Chapellier M, Pluvinaud A, Frija J, de Kerviler E. CT and MRI imaging in tumoral angiogenesis. *Bull Cancer*. 2010 Jan; 97(1):79-90
17. Bellmunt J. Future developments in renal cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2009 May;20 Suppl 1:i13-17.
18. Benzoni E, Rossit L, Cojutti A, Favero A, Saccomano E, Zompicchiatti A, Noce L, Bresadola F, Intini S. Analysis of survival after pancreatic resection for oncological pathologies. *Chir Ital*. 2007 Jan-Feb;59(1):17-25.
19. Beyer A, Born B, Carstens O, Diers T, Dressler R, Goermez M, Müller P, Rohde M, Schütte T, Simon N, Skambraks TJ, Skambraks TO, Spiering S, Wessel ABC. The Boys are back in Town. A Review from the City Theater. Heide 2007-2010.

20. Bhattacharyya M, Ryan D, Carpenter R, Vinnicombe S, Gallagher CJ. Using MRI to plan breast-conserving surgery following neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer*. 2008 Jan 29;98(2):289-93. Epub 2008 Jan 22.
21. Birchard KR, Semelka RC, Hyslop WB, Brown A, Armao D, Firat Z, Vaidean G. Suspected pancreatic cancer: evaluation by dynamic gadolinium-enhanced 3D gradient-echo MRI. *AJR Am J Roentgenol*. 2005 Sep;185(3):700-3.
22. Blackwood WS, Maudgal DP, Pickard RG, Lawrence D, Northfield TC. Cimetidine in duodenal ulcer. Controlled trial. *Lancet*. 1976 Jul 24;2(7978):174-6.
23. Bloch F. Nuclear Induction. *Phys. Rev*. 1946;460
24. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce drug resistance. *Nature* 1997;390:404-7
25. Bruell D, Bruns CJ, Yezhelyev M, Huhn M, Muller J, Ischenko I, Fischer R, Finnern R, Jauch KW, Barth S. Recombinant anti-EGFR immunotoxin 425(scFv)-ETA' demonstrates anti-tumor activity against disseminated human pancreatic cancer in nude mice. *Int J Mol Med*. 2005 Feb;15(2):305-13.
26. Brunner TB, Grabenbauer GG, Meyer T, Golcher H, Sauer R, Hohenberger W. Primary resection versus neoadjuvant chemoradiation followed by resection for locally resectable or potentially resectable pancreatic carcinoma without distant metastasis. A multi-centre prospectively randomised phase II-study of the Interdisciplinary Working Group Gastrointestinal Tumours (AIO, ARO, and CAO). *BMC Cancer*. 2007 Mar 6;7:41
27. Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ. In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia*. 1999 Apr;1(1):50-62.



28. Cai W, Chen K, Mohamedali KA, Cao Q, Gambhir SS, Rosenblum MG, Chen X. PET of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Nucl Med.* 2006 Dec;47(12):2048-56.
29. Celik I, Surucu O, Dietz C, Heymach JV, Force J, Hoschele I, Becker CM, Folkman J, Kisker O. Therapeutic efficacy of endostatin exhibits a biphasic dose-response curve. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):11044-50.
30. Chihara Y, Fujimoto K, Miyake M, Hiasa Y, Hirao Y. Anti-tumor effect of cimetidine via inhibiting angiogenesis factors in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced mouse and rat bladder carcinogenesis. *Oncol Rep.* 2009 Jul; 22(1):23-8
31. Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JW 2nd, Cordon-Cardo C, Yancopoulos GD, DePinho RA. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 1999;400:468-72
32. Chun YS, Vauthey JN. Extending the frontiers of resectability in advanced colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007 Dec;33 Suppl 2:S52-8.
33. Coman DR, Sheldon WF. The significance of hyperemia around tumor implants. *Am J Pathol.* 1946;22:822-31
34. Cornelissen B, Kersemans V, Jans L, Staelens L, Oltenfreiter R, Thonissen T, Achten E, Slegers G. Comparison between 1 T MRI and non-MRI based volumetry in inoculated tumours in mice. *Br J Radiol.* 2005 Apr;78(928):338-42.
35. Czubayko F, Smith RV, Chung HC, Wellstein A. Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors. *J Biol Chem.* 1994 Nov 11;269(45):28243-8.
36. Damadian R, Goldsmith M, Minkoff L., NMR in cancer: XVI. FONAR image of the live human body. *Physiol Chem Phys.* 1977;9(1):97-100, 108
37. Day ED. Vascular relationships of tumor and host. *Prog Tumor Research* 1964;4:57-97

38. De Laurentiis M, Canello G, Zinno L, Montagna E, Malorni L, Esposito A, Pennacchio R, Silvestro L, Giuliano M, Giordano A, Caputo F, Accurso A, De Placido S. Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology. *Ann Oncol.* 2005 May;16 Suppl 4:iv7-iv13.
39. Delperio JR. Surgical resection of pancreatic adenocarcinoma: indications and contraindications, pronostic factors and survival, recent advances. *Cancer Radiother.* 2004 Nov;8 Suppl 1:S73-9
40. Detre JA, Leigh JS, Williams DS, Koretsky AP. Perfusion imaging. *Magn Reson Med.* 1992 Jan;23(1):37-45.  
Differentiation. 2002 Dec;70(9-10):498-505.
41. Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak JT, Dvorak AM. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 1988;133:95-109
42. Elsayes KM, Narra VR, Abou El Abbass HA, Aly TS, Radwan SM, Chen ZM. Pancreatic tumors: diagnostic patterns by 3D gradient-echo post contrast magnetic resonance imaging with pathologic correlation. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2006 Jul-Aug;35(4):125-39.
43. Emens LA. Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Am J Ther* 2005;12:243-53
44. Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland, Robert-Koch-Institut, Berlin, 1999
45. Eskens FA, Sleijfer S. The use of bevacizumab in colorectal, lung, breast, renal and ovarian cancer: where does it fit? *Eur J Cancer.* 2008 Nov;44(16):2350-6. Epub 2008 Sep 11.
46. Farrar CT, Kamoun WS, Ley CD, Kim YR, Kwon SJ, Dai G, Rosen BR, di Tomaso E, Jain RK, Sorensen AG. In vivo validation of MRI vessel caliber index measurement methods with intravital optical microscopy in a U87 mouse brain tumor model. *Neuro Oncol.* 2010 Apr;12(4):341-50.

47. Fasola G, Belvedere O, Aita M, Zanin T, Follador A, Cassetti P, Meduri S, De Pangher V, Pignata G, Rosolen V, Barbone F, Grossi F. Low-Dose Computed Tomography Screening for Lung Cancer and Pleural Mesothelioma in an Asbestos-Exposed Population: Baseline Results of a Prospective, Nonrandomized Feasibility Trial An Alpe-Adria Thoracic Oncology Multidisciplinary Group Study (ATOM 002). *Oncologist*. 2007;12(10):1215-1224.
48. Fidler IJ. The organ microenvironment and cancer metastasis.
49. Flaherty KT, Rosen MA, Heitjan DF, Gallagher ML, Schwartz B, Schnall MD, O Dwyer PJ. Pilot study of DCE-MRI to predict progression-free survival with sorafenib therapy in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2008 Jan 22;7(4)
50. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 1977 Jul;59(1):221-6.
51. Folkman J, Brem H; Angiogenesis and Inflammation. In Gallin JL, Goldstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates* 2nd ed. New York Raven Press;1992:821-9
52. Folkman J, Hochberg M. Self regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 1973;138:745-53
53. Folkman J, Lond DM, Becker FF. Growth and metastasis of tuumor in organ culture. *Cancer* 1963;16:453-67
54. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications *N Engl J Med* 1971;285,1182-6
55. Fox J, Barber D, Bardhan KD. Alternatives to Bayes? A quantitative comparison with rule-based diagnostic inference. *Methods Inf Med*. 1980 Oct;19(4):210-5
56. Fujikawa T, Shiraha H, Nakanishi Y, Takaoka N, Ueda N, Suzuki M, Shiratori Y. Cimetidine inhibits epidermal growth factor-induced cell signaling. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Mar;22(3):436-43.

57. Fukuda M, Tanaka S, Suzuki S, Kusama K, Kaneko T, Sakashita H. Cimetidine induces apoptosis of human salivary gland tumor cells.  
Oncol Rep. 2007 Mar;17(3):673-8.
58. Gehan EA, Schneiderman MA. Historical and methodical developments in clinical trials at the National Cancer Institute. Stat Med 1990; 9: 871-80
59. Gramiak R, Shah PM, Kramer DH. Ultrasound cardiography: contrast studies in anatomy and function. Radiology. 1969 Apr;92(5):939-48.
60. Hahn HK, Millar WS, Klinghammer O, Durkin MS, Tulipano PK, Peitgen HO. A reliable and efficient method for cerebral ventricular volumetry in pediatric neuroimaging. Methods Inf Med. 2004;43(4):376-82.
61. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of Cancer. Cell 2000;100:57-70
62. Hardee ME, Cao Y, Fu P, Jiang X, Zhao Y, Rabbani ZN, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Arcasoy MO. Erythropoietin blockade inhibits the induction of tumor angiogenesis and progression. PLoS ONE. 2007 Jun 20;2(6):e549.
63. Haris K, Efstratiadis SN, Maglaveras N, Katsaggelos AK. Hybrid image segmentation using watersheds and fast region merging. IEEE Trans Image Process. 1998;7(12):1684-99.
64. Harland CC, Saihan EM. Regression of cutaneous metastatic malignant melanoma with topical diphencyprone and oral cimetidine. Lancet. 1989 Aug 19;2(8660):445.
65. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. J Clin Oncol. 2007 Oct 22
66. Heverhagen JT, Hahn HK, Wegmann M, Herz U, Shaffer Whitaker CD, Matschl V, Alfke H. . Volumetric analysis of mice lungs in a clinical magnetic resonance imaging scanner. : MAGMA. 2004 Nov;17(2):80-5.

67. Himmele JC, Rabenhorst B, Werner D. Inhibition of Lewis Lung tumor growth and metastasis by Ehrlich ascites tumor growing in the same host. *J Cancer Res Clin Oncol* 1986;111:160-5
68. Hoppeler H, Kayar SR. Capillarity and oxidative capacity of muscles. *News Physiol Sci* 1988;3:113-6
69. Hurdlicka O. Growth of capillaries in skeletal and cardiac muscle. *Circ Res* 1982;50:451-61
70. Ide AG, Baker NH, Warren, SL. Vascularization of the Browne-Pearce epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber *Am Journal Roentgenology* 1939;42:891-9
71. Iino M, Shiraishi H, Ichihashi K, Hoshina M, Saitoh M, Hirakubo Y, Morimoto Y, Momoi MY. Volume measurement of the left ventricle in children using real-time three-dimensional echocardiography: comparison with ventriculography. *J Cardiol.* 2007 May;49(5):221-9.
72. Inderbitzin D, Gass M, Beldi G, Ayouni E, Nordin A, Sidler D, Gloor B, Candinas D, Stoupis C. Magnetic resonance imaging provides accurate and precise volume determination of the regenerating mouse liver. *J Gastrointest Surg.* 2004 Nov;8(7):806-11.
73. Inoue Y, Yoshikawa K, Nomura Y, Izawa K, Shimada M, Tojo A, Ohtomo K. Gadobenate dimeglumine as a contrast agent for MRI of the mouse liver. *NMR Biomed.* 2007 Feb 13
74. J. Krysa, M. Miller, N. Kukreja, and A. Steger. Pancreatic cancer--is an aggressive approach justified? *Ann R Coll Surg Engl.* 2005 May;87(3):163-6.
75. James K, Eisenhauer E, Christian M, Terenziani M, Vena D, Muldal A et al. Measuring response in solid tumors. Unidimensional versus bidimensional measurement. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 523- 28
76. Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liotta LA. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science* 1983;221:281-3

77. Katalinic A, Bartel C, Raspe H, Schreer I. Beyond mammography screening: quality assurance in breast cancer diagnosis (The QuaMaDi Project). *Br J Cancer*. 2007 Jan 15;96(1):157-61.
78. Kerbel R, Folkman J. Clinical Translation of angiogenesis inhibitors . *Nat Rev Cancer* 2002;2:727-39
79. Kikuchi Y, Oomori K, Kizawa I, Kato K. Effects of cimetidine on tumor growth and immune function in nude mice bearing human ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1985 Feb;74(2):495-8.
80. Kisker O, Becker CM, Prox D, Fannon M, D'Amato R, Flynn E, Fogler WE, Sim BK, Allred EN, Pirie-Shepherd SR, Folkman J. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res*. 2001 Oct 15;61(20):7669-74.
81. Kisker O, Onizuka S, Banyard J, Komiyama T, Becker CM, Achilles EG, Barnes CM, O'Reilly MS, Folkman J, Pirie-Shepherd SR. Generation of multiple angiogenesis inhibitors by human pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2001 Oct 1;61(19):7298-304.
82. Klagsbrun M, Moses M. Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 1999;R217-R224
83. Kleespies, Axel; Köhl, Gudrun; Friedrich, Michael; Ryan, Anderson J.; Barge, Alan; Jauch, Karl-Walter; Bruns, Christiane J. Vascular Targeting in Pancreatic Cancer: The Novel Tubulin-Binding Agent ZD6126 Reveals Antitumor Activity in Primary and Metastatic Tumor Models. *Neoplasia*, Volume 7, Number 10, October 2005, pp. 957-966(10)
84. Kraaij R, van Weerden WM, de Ridder CM, Gussenhoven EJ, Honkoop J, Nasu Y, Bangma CH. Validation of transrectal ultrasonographic volumetry for orthotopic prostate tumours in mice. *Lab Anim*. 2002 Apr;36(2):165-72.
85. Krankheitskosten 2002, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Juli 2004

86. Larbouret C, Robert B, Navarro-Teulon I, Thezenas S, Ladjemi MZ, Morisseau S, Campigna E, Bibeau F, Mach JP, Pelegrin A, Azria D. In vivo therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas. Clin Cancer Res. 2007 Jun 1;13(11):3356-62.
87. Lauterbur PC. Image formation of induced local interactions: examples employing NMR. Nature 1973;242:190-191.
88. Lefranc F, Yeaton P, Brotchi J, Kiss R. Cimetidine, an unexpected anti-tumor agent, and its potential for the treatment of glioblastoma (review). Int J Oncol. 2006 May;28(5):1021-30.
89. Li VW, Folkerth RD, Watanabe H, Yu C, Rupnick M, Barnes P, Scott RM, Black PM, Sallan SE, Folkman J. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumours. Lancet 1994;344:82-6
90. Liotta LA, Saidel MG, Kleinermann J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. Cancer Res 1976;36:889-94
91. Lockhart AC, Rothenberg ML, Berlin JD. Treatment for Pancreatic Cancer: Current Therapy and Continued Progress. Gastroenterology. 2005 May;128(6):1642-54.
92. Lüllmann H, Mohr K, Lutz H. Pharmakologie und Toxikologie. 16. Auflage, 2006. Thieme Verlag.
93. Mahadevia PJ, Fleisher LA, Frick KD, Eng J, Goodman SN, Powe NR. Lung cancer screening with helical computed tomography in older adult smokers: a decision and cost-effectiveness analysis. JAMA. 2003 Jan 15;289(3):313-22.
94. Marler JJ, Rubin JB, Trede NS, Connors S, Grier H, Upton J, Mulliken JB, Folkman J. Successful antiangiogenic therapy of giant cell angioblastoma with interferon alfa 2b: report of 2 cases. Pediatrics. 2002 Feb;109(2):E37.

95. Marshall ME, Mendelsohn L, Butler K, Riley L, Cantrell J, Wiseman C, Taylor R, Macdonald JS. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. *J Clin Oncol.* 1987 Jun;5(6):862-6.
96. Marshall, W. The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention *Med Clin North Am.* 2005 Mar;89(2):313-44.
97. Matsumoto S. Cimetidine and survival with colorectal cancer. *Lancet.* 1995 Jul 8;346(8967):115.
98. McNeil C. Herceptin raises its sights beyond advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:882-3
99. Midgley R, Kerr D. Bevacizumab--current status and future directions. *Ann Oncol.* 2005;16:999-1004
100. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994;367:576-9
101. Miller JC, Pien HH, Sahani D, Sorensen AG, Thrall JH. Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Feb 2;97(3):172-87
102. Mohammad RM, Banerjee S, Li Y, Aboukameel A, Kucuk O, Sarkar FH. Cisplatin-induced antitumor activity is potentiated by the soy isoflavone genistein in BxPC-3 pancreatic tumor xenografts. *Cancer.* 2006 Mar 15;106(6):1260-8.
103. Nagakawa T, Sanada H, Inagaki M, Sugama J, Ueno K, Konishi I, Ohta T, Kayahara M, Kitagawa H, J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2004;11(6):402-8
104. Nagashima T, Sakakibara M, Nakamura R, Arai M, Kadowaki M, Kazama T, Nakatani Y, Koda K, Miyazaki M. Dynamic enhanced MRI predicts chemosensitivity in breast cancer patients. *Eur J Radiol.* 2006 Nov;60(2):270-4. Epub 2006 Aug 22.
105. Nagy JA, Brown LF, Senger DR, et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochem Biophys Acta* 1989;948:305-26



106. Nanus DM, Schmitz-Drager BJ, Motzer RJ, et al. Expression of Basic fibroblast growth factor in primary human renal tumors: correlation with poor survival. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1597-9
107. Natori T, Sata M, Nagai R, Makuuchi M. Cimetidine inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biomed Pharmacother*. 2005 Jan-Feb;59(1-2):56-60
108. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer I* 1994;86:356-61
109. Nicolson GL. Cancer metastasis. *Sci Am* 1979;240:66-76
110. Niemelä M, Mäenpää H, Salven P, Summanen P, Poussa K, Laatikainen L, Jääskeläinen J, Joensuu H. Interferon alpha-2a therapy in 18 hemangioblastomas. *Clin Cancer Res*. 2001 Mar;7(3):510-6.
111. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. *Cancer R* 2005;65:3967-79
112. Olszewski AJ, Grossbard ML, Kozuch PS. The horizon of antiangiogenic therapy for colorectal Cancer. *Oncology* 2005;19:297-306
113. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997 Jan 24;88(2):277-85.
114. Patel JD, Hensing TA, Rademaker A, Hart EM, Blum MG, Milton DT, Bonomi PD. Phase II Study of Pemetrexed and Carboplatin Plus Bevacizumab With Maintenance Pemetrexed and Bevacizumab As First-Line Therapy for Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2009 May 11
115. Petersen I. Antiangiogenesis, anti-VEGF(R) and outlook. *Recent Results Cancer Res*. 2007;176:189-99. Review.
116. Piao Y, Guo M, Gong Y. Diagnostic challenges of metastatic spindle cell melanoma on fine-needle aspiration specimens. *Cancer*. 2008 Feb 7

117. Planche K, Vinnicombe S. Breast imaging in the new era. *Cancer Imaging*. 2004 Jan 12;4(2):39-50
118. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic moments in a solid.1946. *Phys. Rev.* 69,37-38.
119. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell*. 1989;56:345-55
120. Roberts HC, Roberts TP, Bollen AW et al. Correlation of microvascular permeability derived from dynamic contrast-enhanced MR imaging with histologic grade and tumor labeling index: a study in human brain tumors *Acad Radiol* 2001;8:384-391
121. Rockall AG, Reznick RH. Imaging of neuroendocrine tumours (CT/MR/US). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007 Mar;21(1):43-68
122. Roethke MC, Lichy MP, Jurgschat L, Hennenlotter J, Vogel U, Schilling D, Stenzl A, Claussen CD, Schlemmer HP. Tumorsize dependent detection rate of endorectal MRI of prostate cancer-A histopathologic correlation with whole-mount sections in 70 patients with prostate cancer. *Eur J Radiol.* 2010 Mar 11
123. Sahani DV, Shah ZK, Catalano OA, Boland GW, Brugge WR. Radiology of pancreatic adenocarcinoma: Current status of imaging. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Jan;23(1):23-33.
124. Salnikov AV, Groth A, Apel A, Kallifatidis G, Beckermann BM, Khamidjanov A, Ryschich E, Büchler MW, Herr I, Moldenhauer G. Targeting of cancer stem cell marker EpCAM by bispecific antibody EpCAMxCD3 inhibits pancreatic carcinoma. *J Cell Mol Med* 2009 Sep 13(9B):4023-33
125. Sartippour MR, De Leon E, Rubio R, Brooks MN. The effect of commonly used drugs on angiogenesis. *Anticancer Res.* 2003 Jan-Feb;23(1A): 231-4
126. Sauer H. Neue Entwicklungen in der Tumornachsorge. *Versicherungsmedizin* 1999;51:18-23

127. Schachter EN, Neuman T. Targeted therapies for the prevention of lung cancer. *Drugs Today (Barc)*. 2007 Dec;43(12):897-936.
128. Schaefer JF, Schneider V, Vollmar J, Wehrmann M, Aebert H, Friedel G, Vonthein R, Schick F, Claussen CD. Solitary pulmonary nodules: association between signal characteristics in dynamic contrast enhanced MRI and tumor angiogenesis. *Lung Cancer*. 2006 Jul;53(1):39-49. Epub 2006 May 11
129. Schafer CB, Bartzsch OM, Feldmann HJ, Molls M, Allgauer M. Ultrasound volumetry of cervical lymph nodes during radiotherapy as a method of therapy monitoring. *Ultraschall Med*. 1996 Dec;17(6):289-94
130. Schlieff R, Bauer A. [Ultrasound contrast media. New perspectives in ultrasound diagnosis] *Radiologe*. 1996 Jan;36(1):51-7.
131. Schmidt NO, Ziu M, Carrabba G, Giussani C, Bello L, Sun Y, Schmidt K, Albert M, Black PM, Carroll RS. Antiangiogenic therapy by local intracerebral microinfusion improves treatment efficiency and survival in an orthotopic human glioblastoma model. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb 15;10(4):1255-62.
132. Senderowicz AM, Johnson JR, Sridhara R, Zimmerman P, Justice R, Pazdur R. Erlotinib/gemcitabine for first-line treatment of locally advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Oncology (Williston Park)*. 2007 Dec;21(14):1696-706.
133. Seufferlein T, Adler G. The S3 guideline exocrine pancreatic cancer. *Med Klin*. 2009 Nov 15; 104(11):869-74
134. Sherif ZA, Nakai S, Pirollo KF, Rait A, Chang EH. Downmodulation of bFGF-binding protein expression following restoration of p53 function. *Cancer Gene Ther*. 2001 Oct;8(10):771-82.
135. Shing Y, *Science* 1984;223:1996-8
136. Sillman F, *Am J Obstet Gynecol* 1982;139:154-9
137. Soille P. *Morphological Image Analysis*, Springer 2003

138. Statistisches Bundesamt 2002, Entwicklung der Kosten im Gesundheitswesen
139. Strohm WD, Classen M. Anatomical aspects in ultrasonic endoscopy.  
Scand J Gastroenterol Suppl. 1984;94:21-33.
140. Sugarbaker EV, Thorntwaite J, Ketcham AS. Inhibitory effect of a primary tumor on metastasis. In Day SB, Myers WPL, Stansly P, editors. Progress in Cancer research and therapy. New York: Raven;1977 227-40
141. Surgery of malignant pancreatic tumors. Loos M, Friess H, Kleeff J. Radiologe. 2009 Feb;49(2):137-43
142. Surucu O, Middeke M, Hoschele I, Kalder J, Hennig S, Dietz C, Celik I. Tumour growth inhibition of human pancreatic cancer xenografts in SCID mice by cimetidine. Inflamm Res. 2004 Mar;53 Suppl 1:S39-40. Epub 2004 Mar 5
143. Tachezy R, Rob L. [Screening for prevention of cervical cancer in the Czech Republic] Cas Lek Cesk. 2007;146(12):939-44.
144. Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, Arbeit JM, Brown JM, Chao KS, Chapman JD, Eckelman WC, Fyles AW, Giaccia AJ, Hill RP, Koch CJ, Krishna MC, Krohn KA, Lewis JS, Mason RP, Melillo G, Padhani AR, Powis G, Rajendran JG, Reba R, Robinson SP, Semenza GL, Swartz HM, Vaupel P, Yang D, Croft B, Hoffman J, Liu G, Stone H, Sullivan D. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. Int J Radiat Biol. 2006 Oct;82(10):699-757.
145. Taylor JS, Tofts PS, Port R et al. MR imaging of tumor microcirculation: promise for the new millennium J Magn Reson Imaging 1999;10:903-907
146. Tempel C, Neeman M. Perfusion of the rat ovary: application of pulsed arterial spin labeling MRI. Magn. Reson. Med. 1999; 41, 113-23

147. Tempel-Brami C, Neeman M. Non-invasive analysis of rat ovarian angiogenesis by MRI. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Feb 22;187(1-2):19-22.
148. Tezelman S, Giles Y, Tunca F, Gok K, Poyanli A, Salmaslioglu A, Terzioglu T. Diagnostic value of dynamic contrast medium enhanced magnetic resonance imaging in preoperative detection of thyroid carcinoma. *Arch Surg.* 2007 Nov;142(11):1036-41.
149. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors *J. Natl. Cancer Inst.* 2000 92: 205
150. Tomita K, Izumi K, Okabe S. Roxatidine- and cimetidine-induced angiogenesis inhibition suppresses growth of colon cancer implants in syngeneic mice. *J Pharmacol Sci.* 2003 Nov;93(3):321-30.
151. Tsuzuki Y, Mouta Carreira C, Bockhorn M, Xu L, Jain RK, Fukumura D. Pancreas microenvironment promotes VEGF expression and tumor growth: novel window models for pancreatic tumor angiogenesis and microcirculation. *Lab Invest.* 2001 Oct;81(10):1439-51.
152. Udagawa T, Fernandez A, Achilles E-G, et al. Persistence of microscopic human tumors in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *FASEB J* 2002;16:1361-70
153. Villers A, Puech P, Mouton D, Leroy X, Ballereau C, Lemaitre L. Dynamic contrast enhanced, pelvic phased array magnetic resonance imaging of localized prostate cancer for predicting tumor volume: correlation with radical prostatectomy findings. *J Urol.* 2006 Dec;176(6 Pt 1):2432-7.
154. von Lilienfeld-Toal H, Kampmann B. Endoscopic ultrasonic study of the esophagus. *Dtsch Med Wochenschr.* 1985 Oct 4;110(40):1554.

155. Wada S, Tsunoda T, Baba T, Primus FJ, Kuwano H, Shibuya M, Tahara H Rationale for antiangiogenic cancer therapy with vaccination using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 2. *ancer Res.* 2005 Jun 1;65(11):4939-46.
156. Wang B, Gao ZQ, Yan X. Correlative study of angiogenesis and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging features of hepatocellular carcinoma. *Acta Radiol.* 2005 Jul;46(4):353-8.
157. Warren BA. The vascular morphology of cancer. In Peterson H-I, editor. *Tumor blood circulation: angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental human tumors* Florida: CRC Press 1979;1-47
158. WHO handbook for threorting results of cancer treatment. World health organization offset publication ed. 1979
159. Willett CG, Czito BG, Bendell JC. Adjuvant therapy of pancreatic cancer. *Cancer J.* 2007 May-Jun;13(3):185-91.
160. Wisinski KB, Wahl AO, Small W Jr, Benson AB 3rd. Inoperable pancreatic cancer: standard of care. *Oncology (Williston Park).* 2007 Nov;21(13):1558-64.
161. Wolter K, Franzen L, Lohmeier M. *MRI – A new approach in medical Imaging.* 1968
162. Wray CJ, Ahmad SA, Matthews JB, Lowy AM. Surgery for Pancreatic Cancer: Recent Controversies and Current Practice . *Gastroenterology.* 2005 May;128(6):1626-41
163. Yu EY, Mankoff DA. Positron emission tomography imaging as a cancer biomarker. *Expert Rev Mol Diagn.* 2007 Sep;7(5):659-72
164. Zetter BR, Angiogenesis and Tumor metastasis. *Annu rev med* 1998;49:407-24

165. Zhang Z, Yu Y, Xu F, Berchuck A, van Haaften-Day C, Havrilesky LJ, de Bruijn HW, van der Zee AG, Woolas RP, Jacobs IJ, Skates S, Chan DW, Bast RC Jr. Combining multiple serum tumor markers improves detection of stage I epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2007 Oct 4
166. Ziche M, Donnini S, Morbidelli L. Development of new drugs in angiogenesis. 2004;5:485-93
167. Zubrod GC, Schneiderman SM, Frei E, Brindley C, Gold GL, Schnider B. Appraisal of methods for the study of chemotherapy of cancer in man. *J Chronic Dis* 1960; 11: 7-33

# Abbildungsverzeichnis

- 1.1 Krebsterblichkeit in der Bundesrepublik Deutschland von 1990 bis 2000 (Seite 9)
- 1.2 Präzessionsbewegung der Kerndrehachse (Seite 21)
- 2.1 Zeitplan für die erste Messcharge (Seite 27)
- 2.2 Zeitplan für die zweite Messcharge (Seite 28)
- 2.3 Narkotisierte und für die MRT Messung vorbereitete Maus (Seite 30)
- 2.4 Siemens Somatom (Seite 32)
- 2.5 Die Bedienoberfläche von Dynavision (Seite 34)
- 2.6 Bildschirmfoto der Bedienoberfläche von Dynavision (Seite 37)
- 2.7 Hochaufgelöste DESS Aufnahme (Seite 38)
- 2.8 Darstellung der Blase in einer DESS Aufnahme (Seite 39)
- 2.9 Dynamische Messerie (Seite 40)
- 2.10 Gradient Watershed Bildausschittauswahl (Seite 42)
- 2.11 Gradient Watershed Segmentierung (Einschluss) (Seite 44)
- 2.12 Gradient Watershed Segmentierung (Ausschluss) (Seite 45)
- 3.1 Größenzunahme der Tumore im Therapiezeitraum ermittelt mit dem MRT (Seite 47)
- 3.2 Tumolvolumina nach 20 Therapietagen ermittelt mit dem MRT in ml (Seite 49)
- 3.3 Größenzunahme der Tumore im Therapiezeitraum ermittelt mit der Schieblehre und der Formel  $V = a \times b^2 \times 0,52$  (Seite 49)
- 3.4 Tumolvolumina nach 20 Therapietagen in ml ermittelt mit der Schieblehre und der Formel  $V = a \times b^2 \times 0,52$  (Seite 51)
- 3.5 Größenzunahme der Tumore im Therapiezeitraum ermittelt mit der Schieblehre und der Formel  $V = \frac{4}{3} \times \pi \times (a/2 \times b/2)^{3/2}$  (Seite 52)
- 3.6 Tumolvolumina in ml nach 20 Therapietagen, ermittelt mit der Schieblehre und der Formel  $V = \frac{4}{3} \times \pi \times (a/2 \times b/2)^{3/2}$  (Seite 53)
- 3.7 Vergleich der manuell ermittelten Messwerte gegen die Ergebnisse der MRT-Messungen (Seite 54)
- 3.8 Farbkodierte Pixelanalyse (Seite 55)



- 3.9 Mittelwerte der Slope 1 Messungen (Seite 56)
- 3.10 Mittelwerte der TTP Analyse (Seite 57)
- 3.11 Mittelwerte der Integral Analyse (Seite 58)
- 3.12 Mittelwerte der MTT Analyse (Seite 59)

# Anhang

## 1. Stereometrische Formel zur Volumenbestimmung eines Tumors

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 = \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} \right)^3$$

Bei einer elliptischen Sphäre mit den drei unterschiedlichen Durchmesser  $a$ ,  $b$ , und  $c$  gilt näherungsweise:

$$V = \frac{4}{3} \pi \frac{a}{2} \frac{b}{2} \frac{c}{2}$$

Da wir stereometrisch auf 3D hochrechnen, haben wir als Ausgangsgrößen die beiden Durchmesser  $a$  und  $b$ . wobei  $b$  als der kleinere Durchmesser gewählt wird.

$$V = \frac{4}{3} \pi \frac{a}{2} \frac{b}{2} \frac{b}{2} = \frac{\pi}{6} a^2 b$$

Es zeigt sich, dass die obige Formel sehr gut bei runden Kugelgeometrien arbeitet, sprich das gemessene und errechnete Volumen entspricht annähernd dem wahren Volumen. Haben die Tumoren aber längliche Geometrien, dann unterschätzt obige Formel das wahre Volumen.

Um dieses zu umgehen, kann obige Formel unter speziellen Annahmen modifiziert werden.

Wenn  $a$  und  $b$  gleich sind dann gilt:

$$V = \frac{4}{3} \pi \frac{a}{2} \frac{b}{2} \frac{b}{2} = \frac{4}{3} \pi \sqrt{\left( \frac{a}{2} \cdot \frac{b}{2} \right)^3} = \frac{4}{3} \pi \left( \frac{a}{2} \cdot \frac{b}{2} \right)^{3/2}$$

Wenn unter reellen Bedingungen gearbeitet wird, ist  $a$  größer  $b$ . Auch hier zeigt sich, dass obige stereometrische Formel sehr gut arbeitet. Bei kugelförmigen Volumen entsprechen die Ergebnisse der ersten Formel ( $V=\pi/6a^2b$ ). Bei länglichen Geometrien werden die Volumen größer ausgerechnet, was den realen Werten besser entspricht.

### 3. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Arnold, Aumüller, Baacke, Beyer, Barth, Basler, Baum, Behr, Bünz, Burchert, Celik, Cetin, Czubayko, Daut, Dobbelstein, Engenhardt-Cabilic, Geuss, Görg, Görg, Gotzen, Grau, Griss, Herzum, Hofmann, Hoyer, Kern, Klose, Koolmann, Kretschmer, Kroll, Kuhlmann, Langer, Lemke, Lengsfeld, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mann, Martin, Meinhart, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Ossendorf, Printz, Rausch, Remmschmidt, Renz, Richter, Ritter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schmidt, Schnabel, Seitz, Steiniger, Stiletto, Torossian, Vanucchi, Vetter, Vogelmeier, Vogt, Voigt, von Garrel, Wagner, Walter, Walthers, Weihe, Werner, Wirth, Wulff, Zielcke

#### 4. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. H. Alfke für die Überlassung des Themas und für die Betreuung und Unterstützung während der Durchführung.

Dem Leiter der Abteilung für Strahlendiagnostik Herrn Professor Dr. Klose danke ich für die Möglichkeit zur Promotion.

Herrn Boris Keil danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Messungen.

Den MTAs der Abteilung für Strahlendiagnostik danke ich für die Unterstützung während der MRT-Untersuchungen.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben und Frau Anna Menken, die mich während der gesamten Arbeit unterstützt hat..